

LUCAS GHEDIN GHIZZI

**Produção de silagem de planta inteira de soja e sua utilização na  
alimentação de vacas leiteiras**

São Paulo

2020

LUCAS GHEDIN GHIZZI

**Produção de silagem de planta inteira de soja e sua utilização na alimentação  
de vacas leiteiras**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Departamento:**

Nutrição e Produção Animal

**Area de concentração:**

Nutrição e Produção Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo:



Orientador

São Paulo  
2020

**Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buffi/Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3973  
FMVZ

Ghizzi, Lucas Ghedin

Produção de silagem de planta inteira de soja e sua utilização na alimentação de vacas leiteiras / Lucas Ghedin Ghizzi. – 2020.  
88 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rannó.

1. Aditivo. 2. Fermentação. 3. Perfil da gordura do leite. 4. Ponto de colheita. 5. Silagem de soja. I. Título.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

---

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Produção de silagem de planta inteira de soja e sua utilização na alimentação de vacas leiteiras", protocolada sob o CEUA nº 4399230118 (ID 005031), sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Lucas Ghedin Ghizzi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/06/2018.

We certify that the proposal "Whole-plant soybean silage management and its use in dairy cow's diet", utilizing 24 Bovines (24 females), protocol number CEUA 4399230118 (ID 005031), under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Lucas Ghedin Ghizzi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/20/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2018** a **05/2018**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **6 a 9 anos**

N: **24**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **580 a 720 kg**

---

Local do experimento: As vacas serão alojadas em um confinamento tipo free stall, contendo camas individuais de areia com dimensões de 2,5 x 2,0 m (5,0 m<sup>2</sup>). Todos os procedimentos serão realizados nesta instalação, com exceção da ordenha que será realizada em instalação apropriada, localizada ao lado do referido confinamento.

São Paulo, 14 de agosto de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GHIZZI, Lucas Ghedin

**Título: Produção de silagem de planta inteira de soja e sua utilização na alimentação de vacas leiteiras**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo.

Agradeço minha família: meus pais, minha namorada, minha irmã, meu irmão, cunhado e sobrinhos pelo apoio e compreensão incondicional em todos os momentos principalmente naqueles mais difíceis que passamos, para que enfim pudéssemos desfrutar desse momento juntos. Esse título também é de vocês.

Agradeço ao meu orientador Francisco Palma Rennó, que desde o início acreditou no meu potencial, sempre apoiou as iniciativas e não mediu esforços para dar condições de execução a esse grande projeto. Agradeço a ele por me proporcionar vivência prática diária com os animais os quais também contribuíram com minha formação profissional. Obrigado professor Rennó por me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa, cujo nome levo com orgulho por onde passo e por apoiar meu desejo de participar do doutorado “sanduíche”, sem dúvida momento especial em minha carreira da qual jamais esquecerei. Agradeço também ao Professor Luiz Felipe Ferraretto o qual tenho grande admiração, que aceitou um aluno ainda desconhecido a fazer parte de seu grupo de pesquisa fora do Brasil. Não poderia deixar de citar o Professor Enrico Lippi Ortolani o qual deu o “start” para realização desse sonho. Em nome deles estendo meus agradecimentos a todos os professores do Departamento VNP da USP de Pirassununga e do Department of Animal Science da UF de Gainesville-FL.

O meu muito obrigado as amigadas que criei durante esses 4 anos de doutorado, que hoje estão espalhadas por diversos países e que foram fundamentais nessa jornada. Agradeço a todos os colegas de laboratório mestrandos, doutorandos, práticas profissionalizantes, estagiários e IC`s que contribuíram de forma direta ou indireta na realização desse belo projeto. Um agradecimento especial aos hoje colegas doutores Caio S. Takiya (a primeira pessoa que conheci quando mudei de estado para cursar o doutorado, me auxiliou no processo seletivo e que mesmo sem saber sempre me “desafiou” a ser um profissional melhor) e Tiago A. Del Valle (pessoa de inteligência admirável, que compartilhando do seu conhecimento me ajudou a crescer, resolver momentos de dificuldade e incerteza e que faz por merecer o título que carrega). Graças ao empenho de muitas pessoas, tive a oportunidade de poucos em cursar parte do doutorado fora do país. E por isso não poderia deixar de agradecer a recepção e amizade de irmão que recebi de Matheus Pupo e Celso Heizen Jr. bem como de todos os amigos

que tive o privilégio de conhecer durante minha passagem pelos EUA. Sem dúvida apoio indescritível de todos.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite da FMVZ-USP sem os quais não teria sido possível a realização desse experimento e que hoje os tenho como grandes amigos e profissionais. Em nome deles estendo meus agradecimentos aos funcionários do Departamento VNP da USP de Pirassununga e do Department of Animal Science da UF de Gainesville-FL em especial Alessandra, João Paulo, Karen, Halima e Kathy.

Obrigado a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Código de Financiamento 001), pela bolsa de estudos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo auxílio financeiro para execução do projeto (protocolo 425762/2018-1) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão da bolsa de estudos no país (processo nº 2016/23132-8) bem como no exterior (processo nº 2019/02653-8), sem os quais certamente seria difícil chegar até aqui.

Gostaria de agradecer também, aos membros da banca avaliadora: Dr. Jefferson Gandra, Dr. Mikael Neumann, Dr. Patrick Schmidt e Dr. Luiz Ferraretto pela arguição e contribuições para melhoria nesse trabalho e pela honra de ter sido avaliado por profissionais que tanto admiro.

Certamente estes parágrafos não contemplaram todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Mas mesmo aquelas que por ventura não estejam citadas entre essas palavras, estejam certos de meu reconhecimento e gratidão.

## RESUMO

GHIZZI, L. G. **Produção de silagem de planta inteira de soja e sua utilização na alimentação de vacas leiteiras.** 2020. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O presente estudo teve por objetivo: experimento 1: determinar o efeito do estágio fenológico (EF) sobre a composição morfológica e bromatológica da planta de soja (PS) e perdas, perfil de fermentação e composição bromatológica da silagem de planta inteira de soja (SS); experimento 2: avaliar o efeito da inclusão de melaço em pó e inoculante microbiano sobre perdas, perfil de fermentação e composição bromatológica da SS; e experimento 3: avaliar os efeitos da utilização de níveis crescentes de SS nas dietas de vacas em lactação sobre consumo, fermentação ruminal, comportamento alimentar e desempenho produtivo. Duzentos mini silos experimentais foram confeccionados para elaboração dos experimentos 1 e 2. No experimento 1, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado considerando 8 EF (R1 à R8) como tratamentos para as variáveis relacionadas a PS e um delineamento em blocos completamente casualizados (DBC) considerando 5 EF (R3 à R7) como tratamentos e a combinação de aditivos como bloco (4 blocos) para variáveis relacionadas a SS. O avanço do EF aumentou os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), reduziu carboidratos não fibrosos (CNF) na PS e apresentou maiores valores em R4, R5 e R6 para fibra em detergente neutro (FDN) e R3, R4 e R5 para fibra em detergente ácido (FDA). A ensilagem nos EF R6 e R7 reduziu as concentrações de ácido acético, ácido láctico e etanol bem como a capacidade tampão (CT) e aumentou a concentração de nitrogênio amoniacal (NH<sub>3</sub>-N) na SS. A concentração de ácido butírico reduziu com o avanço do EF apresentando menores teores em R5, R6 e R7. Não foi observado efeito do EF sobre valores pH, porém aumentou os teores de MS, MO, PB e EE com maiores valores observados em R7, reduziu os teores de FDA e CNF com menores valores observados em R7 e tendeu a reduzir as concentrações de FDN e lignina em R5 e R7 respectivamente. O maior desaparecimento ruminal da FDN em 96 h foi observada em R7. A melhor combinação entre potencial de produção, perfil de fermentação e maior fração digestível dentre os EF avaliados neste estudo sugerem os EF R6 e R7 para ensilagem da PS. No experimento 2 foi utilizado o DBC considerando com arranjo de tratamentos fatorial 2 × 2 para avaliar a adição de melaço em pó (MEL; 0 e 40 g/kg de



MN) e inoculante [INO; 0 e  $10^5$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*/g de matéria natural (Silobac<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca)]. Os EF de R3 à R7 foram considerados como bloco (5 blocos). A adição de INO aumentou a recuperação de MS em silagens tratadas com MEL. Melaço reduziu as perdas, enquanto que INO tendeu a diminuir a perda por gás. A adição de MEL aumentou a concentração de ácido lático, reduziu demais ácidos orgânicos, NH<sub>3</sub>-N, pH, etanol e CT. A inoculação aumentou a concentração de NH<sub>3</sub>-N ao passo que diminuiu teor de MO. Melaço aumentou a concentração de PB, CNF e diminuiu o teor de MO, FDN, FDA, lignina e EE, além de aumentar o desaparecimento ruminal da MS e FDN. O uso de INO não mostrou efeitos positivos na SS quando não associado ao MEL, ao passo que este teve grande impacto na qualidade da SS, reduzindo perdas, melhorando o perfil de fermentação e composição bromatológica, podendo ser considerado como aditivo ao processo de ensilagem da PS. No experimento 3, 24 vacas (sendo 8 canuladas no rúmen) multíparas da raça Holandesa foram alocados em um delineamento quadrado Latino 4×4 com 21 dias de duração cada período e os tratamentos obtidos em arranjo em níveis: controle com silagem de milho (SM) como única fonte de volumoso na ordem de 480 g/kg de MS da dieta e substituição da SM por SS na proporção de 0, 16, 33 e 50% da MS. A adição de SS linearmente reduziu o consumo e digestibilidade no trato total da MS bem como o consumo de partículas < 4 mm. Vacas alimentadas com SS linearmente aumentaram o pH ruminal e os teores de butirato, nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia ramificada do rúmen. A substituição da SM por SS reduziu linearmente a produção de leite e sólidos bem como linearmente aumentou a concentração de ácidos graxos insaturados (C18:1 e C18:2) e de cadeia longa (> C16). A síntese de proteína microbiana foi linearmente reduzida enquanto a ureia sérica foi linearmente aumentada pela inclusão de SS. Um efeito quadrático positivo foi observado para tempo de ruminação e mastigação (min/dia) para animais alimentados com SS. A substituição de SM por SS ensilada no estágio fenológico R5,5 reduziu o consumo alimentar e a produção pelas vacas leiteiras sem afetar o teor de gordura no leite. Entretanto, a inclusão de SS na dieta de vacas leiteiras pode ser utilizado para modular a fermentação ruminal e aumentar o teor de ácidos graxos de cadeia longa e insaturados na gordura do leite.

**Palavras-chave:** Aditivo. Fermentação. Perfil da gordura do leite. Ponto de colheita. Silagem de soja.

## ABSTRACT

GHIZZI, L. G. **Whole-plant soybean silage management and its use in dairy cow`s diet**. 2020. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The objectives of the present study were: experiment 1: determine the effects of phenological stage (ST) on morphological and chemical composition of soybean plant (WPS), and on losses, fermentation and chemical profile of SS; experiment 2: evaluate the effects of addition of molasses and microbial inoculation on losses, fermentation and chemical profile of SS; and experiment 3: evaluate the effects of increasing level of SS on dairy cow`s diet on feed intake, ruminal profile, feeding behavior, and milk yield. For experiments 1 and 2, 200 mini silos were used. The experiment 1 was carried out in a complete randomized design to evaluate the effect of 8 ST (R1 to R8) on WPS variables and a in a complete randomized block design (CBD) considering the effects of 5 ST (R3 to R7) as treatments and the additive combination for blocking (4 blocks) on SS variables. Increasing PS increased dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), and ether extract (EE) contents, decreased non fiber carbohydrates (NFC) content and showed higher neutral detergent fiber (NDF) content at R4, R5, and R6 along with acid detergent fiber (ADF) content at R3, R4, and R5. Ensiling at R6 and R7 decreased acetic and lactic acids, and ethanol contents as well as buffering capacity (BC) and increased ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) content of SS. Butyric acid content was decreased with increasing ST with lower value at R5, R6, and R7. There was no ST effect on SS pH values, however, increasing ST increased DM, OM, CP, and EE contents with highest values at R7, decreased ADF and NFC contents with lowest values at R7 and tended to decrease NDF and lignin contents of SS at R5 and R7 respectively. The highest NDF ruminal disappearance was observed at R7. The best combination among forage mass yield, fermentation profile and higher digestible fraction among evaluated ST in the present study suggests R6 and R7 for WPS ensiling. The experiment 2 was carried out in a CBD with a 2 × 2 factorial arrangement of treatments, to evaluate the addition of molasses (MOL; 0 and 40 g/kg fresh forage) and microbial inoculation [INO; 0 and 10<sup>5</sup> CFU (*Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*)/g fresh forage] on WPS ensiling. The ST from R3 to R7 were used for blocking (5 blocks). Inoculant increased DM recovery in MOL-treated silage. Molasses decreased losses, whereas INO tended to

decrease gas losses. The addition of molasses increased lactic acid and reduced other organic acids, ammonia (NH<sub>3</sub>-N), and ethanol concentration, pH, and BC. Inoculant increased NH<sub>3</sub>-N, while decreased OM concentration. Molasses increased the concentration of CP, NFC, and decreased OM, NDF, ADF, lignin, and EE contents, besides improved ruminal disappearance of DM and NDF. The use of INO didn't provided positive results if not associated with MOL, while MOL improved SS quality, reduced losses, improved fermentative profile and chemical composition, might be used as additive at WPS ensiling. For experiment 3, 24 Holstein cows (8 of which were rumen cannulated) were enrolled in a replicated 4×4 Latin square experiment (21 d-periods) and arrangement of treatments of levels: control diet with 480 g/kg dry matter (DM) of corn silage as only forage source and SS replacing CS at 16, 33, and 50 g/kg DM. Soybean silage linearly decreased DM intake and digestibility, and intake of feed particles shorter than 4 mm. Cows fed SS had a linear increase in ruminal pH and ruminal concentrations of butyrate, branched-chain fatty acids, and NH<sub>3</sub>-N. Soybean silage linearly decreased milk and solids yield. Dietary inclusion of SS at the expense of CS linearly increased milk fat concentration of unsaturated (C18:1 and C18:2) and long-chain fatty acids (>C16). Microbial protein synthesis was linearly decreased, and blood urea nitrogen concentration was linearly increased by SS treatments. Soybean silage had a positive quadratic effect on periods of rumination and chewing (min/d). Replacing CS with SS ensiled at R5,5 phenological stage decreases feed intake and performance of cows, without affecting milk fat content. Dietary SS, however, can be used to modulate ruminal fermentation and increase long-chain fatty acids (>C16) and unsaturated fatty acids proportion on milk fat.

**Keywords:** Additive. Fermentation. Harvest timing. Milk fatty acids profile. Soybean silage.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estádios fenológicos da cultura da soja .....	17
Figura 2.1 - Efeito do estágio fenológico sobre o potencial de produção da planta inteira de soja para ensilagem .....	38
Figura 2.2 - Efeito do estágio fenológico sobre a temperatura da silagem de planta inteira de soja exposta ao ar. ....	40
Figura 3.1 - Efeito da adição de melaço e inoculante microbiano sobre temperatura da silagem de planta inteira de soja exposta ao ar.....	56
Figura 4.1 - Análise da adoção de silagem de planta inteira de soja no sistema de produção animal.....	88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Dias relativos ao plantio para lavoura atingir o ponto de colheita. ....	30
Tabela 2.1 - Efeito do estágio fenológico sobre a caracterização morfológica e peso da planta inteira de soja .....	35
Tabela 2.2 - Efeito do estágio fenológico sobre a composição bromatológica dos componentes botânicos da planta inteira de soja (g/kg de MS) .....	36
Tabela 2.3 - Efeito do estágio fenológico sobre a composição bromatológica e desaparecimento ruminal <i>in situ</i> da MS da planta inteira de soja (media ponderada em g/kg de MS) ....	37
Tabela 2.4 - Efeito do estágio fenológico sobre perdas e recuperação de matéria seca da silagem de planta inteira de soja (g/kg MS) .....	38
Tabela 2.5 - Efeito do estágio fenológico sobre perfil de fermentação da silagem de planta inteira de soja .....	39
Tabela 2.6 - Efeito do estágio fenológico sobre a composição bromatológica e desaparecimento ruminal <i>in situ</i> da MS e FDN da silagem de planta inteira de soja. ....	40
Tabela 3.1 - Composição bromatológica do melaço e da planta inteira de soja antes da ensilagem (g/kg de MS).....	52
Tabela 3.2 - Efeito da adição de melaço e inoculante microbiano sobre perdas e recuperação de matéria seca da silagem de planta inteira de soja (g/kg MS) .....	53
Tabela 3.3 - Efeito da adição de melaço e inoculante microbiano sobre perfil de fermentação da silagem de planta inteira de soja .....	54
Tabela 3.4 - Efeito da adição de melaço e inoculante microbiano sobre a composição bromatológica e desaparecimento ruminal <i>in situ</i> da MS e FDN da silagem de planta inteira de soja. ....	55
Tabela 4.1 - Ingredientes, composição bromatológica e distribuição média de partículas das dietas experimentais .....	67
Tabela 4.2 - Consumo de matéria seca e nutrientes, digestibilidade aparente no trato total e índice de seleção de partículas de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.....	74
Tabela 4.3 - Perfil de ácidos graxos, pH e concentração de NH <sub>3</sub> -N ruminais de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.....	74
Tabela 4.4 - Produção e composição do leite, nitrogênio ureico no leite, eficiência leiteira e síntese de proteína microbiana de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.....	75
Tabela 4.5 - Perfil de ácidos graxos da gordura do leite de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja. ....	76
Tabela 4.6 - Metabólitos séricos de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.....	76
Tabela 4.7 - Comportamento ingestivo de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.....	77
Tabela 5.1 – Estimativa de custo de produção da silagem de planta inteira de soja. ....	87

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>15</b>
1.1	PAPEL DA SOJA NO SISTEMA DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIO .....	15
1.2	SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA.....	15
1.2.1	Estádio fenológico da soja para ensilagem.....	17
1.2.2	Aditivos na ensilagem de planta inteira de soja .....	18
1.2.3	Silagem mista de soja e milho .....	19
1.3	Uso da Silagem de Planta Inteira de Soja na Alimentação de Ruminantes .....	20
1.4	Referências.....	22
<b>2</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA EM DIFERENTES ESTÁDIOS FENOLÓGICOS</b> .....	<b>26</b>
2.1	RESUMO.....	26
2.2	ABSTRACT.....	27
2.3	INTRODUÇÃO .....	28
2.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	29
2.4.1	Estabelecimento da cultura.....	29
2.4.2	Caracterização morfológica, composição bromatológica e potencial de produção .....	30
2.4.3	Ensilagem .....	31
2.4.4	Avaliação de perdas e recuperação de matéria seca .....	32
2.4.5	Perfil de fermentação.....	32
2.4.6	Composição bromatológica e desaparecimento ruminal <i>in situ</i> da silagem de planta inteira de soja.....	33
2.4.7	Estabilidade aeróbica .....	34
2.4.8	Análise estatística .....	34
2.5	RESULTADOS .....	35
2.5.1	Caracterização morfológica, composição bromatológica e potencial de produção .....	35
2.5.2	Perdas, perfil de fermentação, composição bromatológica e estabilidade aeróbica .....	38
2.6	DISCUSSÃO .....	41
2.7	CONCLUSÕES .....	44
2.8	REFERÊNCIAS.....	44
<b>3</b>	<b>EFEITO DA ADIÇÃO DE INOCULANTE MICROBIANO E MELAÇO EM PÓ NA ENSILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA</b> .....	<b>48</b>
3.1	RESUMO.....	48
3.2	ABSTRACT.....	49
3.3	INTRODUÇÃO .....	49
3.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	51
3.4.1	Delineamento experimental e ensilagem.....	51
3.4.2	Análises laboratoriais .....	52
3.4.3	Análise estatística .....	52

3.5	RESULTADOS .....	53
3.5.1	Perdas fermentativas.....	53
3.5.2	Perfil de fermentação.....	54
3.5.3	Composição bromatológica e desaparecimento ruminal <i>in situ</i> .....	54
3.5.4	Estabilidade aeróbica.....	55
3.6	DISCUSSÃO .....	56
3.7	CONCLUSÕES .....	59
3.8	REFERÊNCIAS.....	59
<b>4</b>	<b>SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE SILAGEM DE MILHO POR SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA NA DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES, FERMENTAÇÃO RUMINAL E PERFIL DA GORDURA DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS .....</b>	<b>63</b>
4.1	RESUMO.....	63
4.2	ABSTRACT.....	64
4.3	INTRODUÇÃO .....	64
4.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	65
4.4.1	Produção e utilização da silagem de soja .....	66
4.4.2	Animais, delineamento experimental e arranjo de tratamentos.....	66
4.4.3	Coleta amostral .....	68
4.4.4	Análises laboratoriais .....	69
4.4.5	Cálculos e análise estatística.....	71
4.5	RESULTADOS .....	73
4.6	DISCUSSÃO .....	77
4.7	CONCLUSÕES .....	80
4.8	REFERÊNCIAS.....	81
<b>5</b>	<b>IMPLICAÇÕES .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 PAPEL DA SOJA NO SISTEMA DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIO

Segundo Conab (2020), a estimativa da área cultivada no Brasil na safra 2019/2020 foi de aproximadamente 64,1 milhões de hectares considerando primeira e segunda safras, uma área 1,5% maior em relação a safra passada. Deste total, cerca de 96% foram destinadas a culturas de verão sendo o milho de 1º e 2º safra e soja, responsáveis por 6,7, 20,9 e 59,8% respectivamente. Embora não existam informações oficiais quanto a destinação da área cultivada para produção de silagem, o nível de inclusão de silagem de milho (SM) em dietas de vacas leiteiras no Brasil é na ordem de 49,2% da matéria seca (MS; SILVA, et al., 2019) e a indicação desta como primeira opção de volumoso por nutricionistas em confinamento de gado de corte passou de 25,8 (MILLEN et al., 2009) para 63,6% (PINTO et al., 2018) em 10 anos.

Essa alta demanda por alimentos ensilados na produção animal aliada a exportação de nutrientes e carbono (C) do solo por conta do processo de ensilagem, torna necessária a utilização de técnicas de manejo como a rotação de cultura que conhecidamente viabilizam maior aporte de matéria orgânica no solo (SANTOS et al., 2019; XAVIER et al., 2019) aumentando a sustentabilidade do sistema.

Santos et al. (2019) concluíram que a adoção da cultura da soja seguida de gramínea no inverno é uma estratégia efetiva de otimizar o sistema de plantio direto quanto a redução da emissão de CO<sub>2</sub> e conseqüentemente aumento do estoque de C no solo. A participação das leguminosas nesse processo está relacionada a característica da baixa relação C e nitrogênio (N) a qual lhe confere rápida decomposição e liberação de nutrientes ao solo (GIACOMINI et al., 2003).

Atualmente considera-se o sistema de fixação biológica de N proporcionada pela introdução de plantas como a soja em sistemas de produção de forragem, o método mais eficiente e economicamente viável de incorporação de N no solo (CHEN et al., 2020) e tem papel fundamental na redução da demanda de fertilizantes químicos (XAVIER et al., 2019).

### 1.2 SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA

De acordo com os recentes levantamentos nacionais, a unanimidade das fazendas de produção de leite utilizam o farelo de soja como principal fonte proteica em dietas para vacas



em lactação (SILVA et al., 2019), sendo este também predominante em confinamentos de gado de corte (PINTO et al., 2018).

Apesar dos benefícios já mencionados sobre a introdução da cultura da soja em sistemas de produção agropecuários, nota-se que, embora predominante em termos de área cultivada e largamente utilizada como principal fonte proteica em dietas para ruminantes, atualmente a participação da soja nesse contexto se dá exclusivamente via fornecimento de grãos e seus derivados independentemente do tipo de exploração (PINTO et al., 2018; SILVA et al., 2019), ficando assim os produtores reféns do preço de mercado para aquisição desses alimentos.

Nesse contexto a possibilidade de produção e armazenamento de alimentos proteicos na propriedade rural como a silagem de planta inteira de soja (SS) conhecida pelo seu elevado teor de proteína bruta na composição (EVANGELISTA et al., 1991), é uma oportunidade de redução dos custos de produção. A ensilagem por definição é um método anaeróbico de conservação de alimentos que baseiam-se na conversão de carboidratos solúveis em ácidos orgânicos por atividade majoritariamente bacteriana (MCDONALD et al., 1991). Essa tecnologia aplicada à produção de forragem é imprescindível em sistemas intensivos de produção de leite, visto que a inclusão de silagem no sistema de produção mantém a regularidade de oferta de nutrientes ao longo do ano (ROTZ et al., 2003).

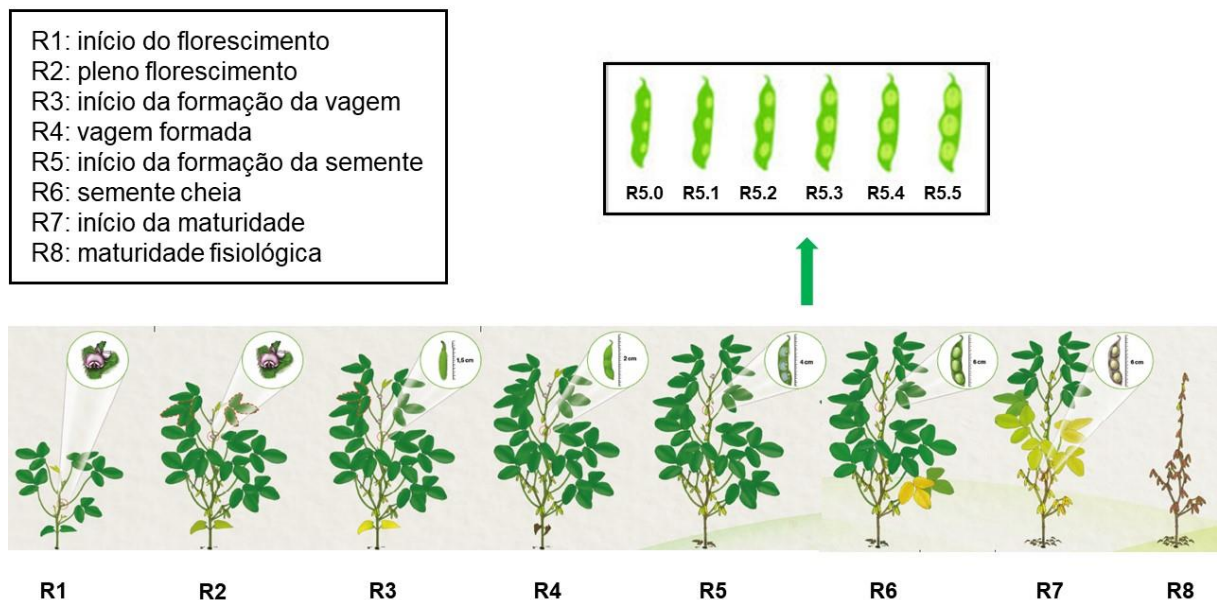
Características químico-físicas das plantas influenciam diretamente na sua ensilabilidade. A cultura da soja assim como outras leguminosas de forma geral, apresenta alto teor de proteína bruta e baix teor de carboidratos solúveis e MS, o que resulta em maior capacidade tampão e menor poder de fermentação quando comparada a silagens de gramíneas (EVANGELISTA et al., 1991). Tais características resultam numa lenta e prolongada fermentação e resistência ao abaixamento do pH tornando a silagem de leguminosas suscetível à fermentação secundária por agentes patogênicos como bactérias do gênero *Clostridium*, as quais elevam concentrações de ácido butírico, reduzindo o potencial de consumo pelos animais (MCDONALD et al., 1991).

Contudo, pesquisas com foco na viabilização da SS para alimentação de ruminantes vêm sendo conduzidas em várias regiões no Brasil (ROSA, 2018; GANDRA et al., 2019; PARRA et al., 2019) e no mundo como Costa Rica (TOBÍA et al., 2008), Canadá (VARGAS-BELLO-PEREZ et al., 2008), Cuba (LIMA et al., 2010), Japão (KAWAMOTO et al., 2013), Itália (SPANGHERO et al., 2015), África do Sul (NKOSI et al., 2016), e China (NI et al., 2017), demonstrando existir ferramentas de manejo que podem ser adotadas para minimizar o baixo poder fermentativo dessa leguminosa.

### 1.2.1 Estádio fenológico da soja para ensilagem

Embora a cultura da soja seja reconhecida pelo seu elevado teor protéico, sua composição bromatológica varia ao longo do ciclo reprodutivo. De acordo com Fehr e Caviness (1977) o estágio fenológico (EF) da cultura da soja durante a fase reprodutiva, pode ser classificada em: R1 início do florescimento; R2 pleno florescimento; R3 início da formação da vagem; R4 vagem formada; R5 início da formação da semente; R6 semente cheia; R7 início da maturidade; e R8 maturidade fisiológica (Figura 1.1).

Figura 1.1 - Estádios fenológicos da cultura da soja



Fonte: Ghizzi (2020) adaptado de Fehr e Caviness (1977). Ilustrações Fort Green®.

De acordo com Coffey et al. (1995) a SS colhida no estágio R6 apresentaram o dobro da produção de MS por hectare quando comparado com R2. Ainda segundo os autores, quando ensiladas em R2 e R4 as SS apresentaram maior valor de pH e concentração de amônia em comparação com a colhida em R6 em dois anos de avaliação consecutivas. Dias et al. (2010) ao avaliar dois ciclos de produção, constatou que entre R3 e R6 houve um aumento na ordem de 8,25% no teor de MS. Contudo uma diferença de 4,5% no teor de MS para R5 foi observado entre os ciclos, sendo essa variação atribuída ao estresse hídrico enfrentado no segundo ano de avaliação demonstrando a volatilidade da estimativa.

Atribui-se a alterações morfológicas na planta o aumento nas concentrações de proteína bruta e extrato etéreo na SS colhidas em EF avançados uma vez que há maior participação de

grãos na MS da planta (OLIVEIRA et al., 2016). Contudo esse aumento não é constante e varia em função de fatores como ciclo produtivo (DIAS et al., 2010; SPANGHERO et al., 2015), cultivar (OLIVEIRA et al., 2016) proporção dos componentes botânicos na planta e composição bromatológica dos mesmos (ZHAI et al., 2013). Kawamoto et al. (2013) sugeriram que o EF R7 deveria ser o ponto de colheita da planta de soja (PS) para ensilagem em detrimento ao R6 um vez que este apresentou maior capacidade de preservação da proteína.

Da mesma forma que EF iniciais (< R5) estão associados a produção de SS com altas perdas de MS e nutrientes por produção de efluente, concentrações de ácido butírico e amônia (COFFEY et al., 1995), acredita-se que estádios mais avançados (> R6) podem apresentar limitações na ordem de produtividade em função da queda das folhas, fermentação devido aos elevados teores de EE nos grãos e digestibilidade da MS pela maior proporção de compostos fibrosos e lignificados da planta. Contudo não existem trabalhos consistentes que avaliaram produção de SS em EF iguais ou superiores a R7 considerando fatores de produtividade associado ao perfil de fermentação.

### **1.2.2 Aditivos na ensilagem de planta inteira de soja**

O uso de aditivos químicos e microbiológicos tem mostrado resultados importantes e ajudado a nortear as pesquisas com SS. Enquanto a adição de melaço como fonte de carboidratos solúveis demonstra resultados promissores, a inoculação bacteriana apresenta resultados variáveis, dependendo da associação com outros aditivos e da cepa utilizada.

Ao estudarem o efeito do uso de inoculante com cepas de bactérias heterofermentativas (*Pediococcus acidilactici* e *L. buchneri*) associado a um blend enzimático (celulase e hemicelulase) em duas cultivares de soja colhidas no EF R6, Nkosi et al. (2016) observaram aumento do pH e redução da recuperação de MS apesar do aumento no teor de ácido lático e na estabilidade aeróbica em silagens inoculadas.

Com intuito de aumentar a disponibilidade de carboidratos solúveis e garantir a presença de bactérias ácido lácticas no material ensilado, Tobía et al. (2008) adicionaram doses crescentes de melaço de pó [0, 30, 60 e 90 g/kg de matéria natural (MN)] associada a inoculação de cepas heterofermentativas ( $6,5 \times 10^7$  UFC de *Lactobacillus brevis*/g de MN) em uma cultivar de soja colhida em EF R6. Os autores observaram redução linear na concentração de componentes fibrosos, de amônia e do pH (5,87, 4,45, 4,05 e 4,00, respectivamente), não diferindo este último entre os maiores níveis de inclusão do melaço.

Ni et al. (2017) testaram o efeito de duas doses de melação em pó (5 e 20 g/kg de MN) e a combinação de cepas homofermentativas ( $10^6$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*/g de MN) sobre o perfil de fermentação da SS e observaram que a maior dose de melação associada ao inoculante foram efetivos na melhoria da qualidade da SS em relação ao controle. Estudo semelhante foi realizado por Rosa et al. (2018) que demonstraram haver efeito do tempo de ensilagem na resposta aos aditivos, com aumento constante da concentração de produtos finais da fermentação até 56 dias de ensilagem.

Gandra et al. (2018) trabalhando com SS colhida no EF R6 e ensilada com quitosana (5 g/kg de MN) e/ou inoculante de cepas homofermentativas ( $4 \times 10^{10}$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e  $2,6 \times 10^{10}$  UFC de *Pediococcus acidipropionici* /g de MN) demonstraram efeito positivo dos aditivos quando aplicados de forma isolada. O efeito sinérgico destes foram observados apenas na redução de perdas por gás e contagem de fungos e leveduras após a abertura.

Embora bactérias consideradas homofermentativas ou heterofermentativas facultativas tenham marcadamente demonstrado melhora na fermentação e maior recuperação de MS em leguminosas segundo estudo meta-analítico de OLIVEIRA et al. (2017), ainda exista grande variação nos efeitos de inoculantes nos estudos com SS.

### 1.2.3 Silagem mista de soja e milho

A prática do consórcio entre culturas de diferentes espécies visa a complementação de forma sinérgica das características físico-químicas desejáveis para o processo de ensilagem. Tendo em vista o potencial nutricional da PS na alimentação de ruminantes e as limitações deste para ensilagem, o consórcio desta com o milho que apresenta ótimas condições de ensilabilidade tem sido descrito na literatura.

É de senso comum no meio científico que ocorra uma redução no teor de MS para silagem mista de soja e milho quando comparada com apenas SM (BAGHDADI et al., 2016; STELLA et al., 2016; PARRA et al., 2019). Contudo vale ressaltar que a intensidade dessa queda é dependente do teor de MS da planta inteira de milho e do EF em que a PS foi ensilada.

De maneira geral, a silagem mista de milho e soja apresenta maior teor de proteína bruta em sua composição, porém a magnitude desse aumento varia de acordo com o nível de inclusão da soja no material ensilado (BAGHDADI et al., 2016; PARRA et al., 2019). Nesse contexto, Baghdadi et al. (2016) encontraram aumento de 27,4% no teor de proteína bruta na silagem mista de soja e milho 75:25 respectivamente comparado a SM. Acréscimo ainda maior

na ordem de 55,6% foi reportado por Stella et al. (2016) no mesmo nível de inclusão da soja no material ensilado. Em recente estudo, Parra et al. (2019) avaliaram diferentes proporções de PS ensilada em R5 e milho sobre parâmetros fermentativos. Com níveis de inclusão da soja variando de 0 até 500 g/kg da MN e aumentos de 125 g/kg entre níveis, os autores concluíram que apesar do aumento linear no teor de proteína bruta, o aumento da fração nitrogenada ocorreu na forma solúvel e/ou associada a fração fibrosa.

Diferentemente para os teores de MS e PB, o efeito da ensilagem mista para os demais componentes bromatológicos é variado. Enquanto estudos reportam redução no teor de fibra em detergente neutro (FDN) esse mesmo efeito não se reflete para fibra em detergente ácido gerando variações de resultados quanto a digestibilidade da MS e fração fibrosa a medida em que aumenta-se a participação da soja no material ensilado (BAGHDADI et al., 2016; STELLA et al., 2016; PARRA et al., 2019). Ao contrário do que se esperava, a ensilagem mista de soja e milho não resulta no aumento da estabilidade aeróbica do material ensilado porém mantém o padrão encontrado na SM individual (BOLSON, 2018; PARRA et al., 2019).

Embora não exista consenso sobre a proporção ideal entre soja e milho para produção de silagem mista, alguns autores sugerem a proporção de 500 g/kg de MN em função da melhor digestibilidade da MS observada a partir dessa proporção (BAGHDADI et al., 2016; STELLA et al., 2016).

### 1.3 USO DA SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

As dietas de ruminantes são formuladas a partir da combinação de alimentos, volumosos e concentrados com o objetivo de fornecer nutrientes em quantidades suficientes para atender às exigências dos animais (NRC, 2001; NRC 2016). Há um consenso entre técnicos e nutricionistas de ruminantes de que a utilização de uma silagem de qualidade na dieta contribui significativamente para a melhora dos índices produtivos e a redução dos custos de produção. Apesar de pesquisas mostrarem um potencial uso da SS na alimentação de ruminantes como fonte de proteína advinda de forragem, poucos trabalhos avaliando a resposta animal foram realizados.

Dado a importância da participação da fibra na dieta de ruminantes, níveis elevados desse nutriente podem comprometer o consumo de MS (CMS; MERTENS, 1994). Melo Filho (2006), ao avaliar 20 variedades de soja e duas linhagens (precoce e tardia) colhidas em R6 sem adição

de aditivos quanto a características bromatológicas, encontrou valor médio do FDN de 536 g/kg de MS, sendo a que a amplitude encontrada para essa característica variou de 474 a 572 g/kg de MS. Apesar da variação no teor desse nutriente entre estudos, vale ressaltar que tão importante quanto produzir silagens com baixos teores de FDN, é a produção deste com maior digestibilidade no trato digestório total (OBA; ALLEN 1999). Rigueira et al., (2015) observaram maior CMS e digestibilidade de nutrientes, porém sem diferença no desempenho em bovinos de corte alimentados com SS adicionada de melaço no momento da ensilagem comparada aos alimentados com SS sem uso do aditivo.

Silva (2010) ao avaliar diferentes proporções (20:80; 40:60 e 60:40) respectivamente entre SS e SM na dieta de bovinos de corte em dois experimentos, não encontrou efeito sobre a fermentação ruminal, embora o CMS e desempenho dos animais caíram a medida que aumentou-se a participação da SS na dieta. Lima et al. (2013) substituíram parte do concentrado por SS em dietas à base de ponta de cana-de açúcar e observaram aumento no CMS e nutrientes sem diferença na conversão alimentar e ganho de peso médio diário de cordeiros ficando a decisão da utilização de SS na dependência da relação custo benefício entre a aquisição do concentrado proteico e da produção da proteína oriunda da foragem.

Protes et al., (2018) demonstraram não haver diferença no desempenho produtivo, características de carcaça e comportamento alimentar de cordeiros terminados com SS colhida no EF R7 em comparação a silagem de sorgo como única fonte de volumoso. Contudo ao comparar o desempenho de cordeiros com SM e SS como volumoso exclusivo na dieta ou silagem mista de soja e milho (15% de SS na MN) Bolson (2018) observou resultados similares entre a silagem mista e a SM, enquanto que a SS resultou em menor desempenho dos animais, não recomendando esta como fonte exclusiva de volumoso em sistemas intensivos de produção.

Vargas-Bello-Perez et al. (2008) ao avaliarem a inclusão de SS ou silagem de alfafa em detrimento a SM na ordem de 720 g/kg da MS do volumoso na dieta de vacas leiteiras, constataram que o CMS (23,5 vs 25,1 kg) e a produção de leite (35,5 vs 37,2 kg) foram menores para vacas alimentadas com SS em relação a silagem de alfafa, atribuindo esse resultado ao maior teor de FDN na SS (7,6% maior). Contudo a produção de leite corrigida para energia e a eficiência leiteira foram similares para ambos os tratamentos, havendo ainda aumento nos teores de gordura (3,8 vs 3,6 %) no leite do grupo que recebeu SS.

Os escassos trabalhos utilizando SS na avaliação do desempenho animal demonstram resultados inconsistentes. A variada composição bromatológica apresentada pela SS ainda é um gargalo na utilização desse alimento na produção de ruminantes e por isso, diversos outros

fatores desde o processo de ensilagem e qualidade de fibra, até o nível de inclusão da SS na dieta ainda precisam ser elucidados.

#### 1.4 REFERÊNCIAS

BAGHDADI, A.; HALIM, R. A.; RADZIAH, O.; MARTINITHE, M. Y.; EBRAHIMI, M. Fermentative characteristics and nutritive value of corn silage intercropped with soybean under different crop combination ratios. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1710-1717, 2016.

BOLSON, D. C. **Características agronômicas e valor alimentício das silagens de milho e soja em monocultivo e consorciadas, avaliados em ovinos em terminação**. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 2018. p.92.

CHEN, R. H.; YANG, Z.; YUAN, S.; ZHOU, X. Research status of soybean symbiosis nitrogen fixation. **Oil Crop Science**, v. 5, n. 1, p.6-10, 2020.

COFFEY, K. P.; GRANADE, P. G. V.; MOYER, J. L. Nutrient content of silage made from whole-plant soybeans. **The Professional Animal Scientist**, v. 11, p. 74-80, 1995.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2019/2020. Brasília, Quarto inventário, v. 7, n. 4, p. 104, 2020.

DIAS, F. J.; JOBIM, C. C.; FILHO, J. L. S.; BUMBIERIS JUNIOR, V. H.; POPPI, E. C.; SANTELLO, G. A. Composição química e perdas totais de matéria seca na silagem de planta de soja. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 1, p. 19-26, 2010.

EVANGELISTA, A. R.; GARCIA, R.; OBEID, L. A.; GALVÃO, J. D. Consórcio de milho-soja: rendimento forrageiro, qualidade e valor nutricional das silagens. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 20, p. 578-584, 2001.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; **Stage of soybean development**. Special report 80. Co-operative Extension Service, Iowa State University, Ames, Iowa, EUA, 1977.

GANDRA, J. R.; TAKIYA, C. S.; DEL VALLE, T. A.; OLIVEIRA, E. R.; DE GOES, R. H. T. B.; GANDRA, E. R. S.; BATISTA, J. D. O.; ARAKI, H. M. C. Soybean whole-plant ensiled with chitosan and lactic acid bacteria: Microorganism counts, fermentative profile, and total losses. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 1-10, 2018.

GIACOMINI, S. J.; AITA, C.; VENDRUSCOLO, E. R. O.; CUBILLA, M.; NICOLOSO, R. S.; FRIES, M. R. Matéria seca, relação C/N e acúmulo de nitrogênio, fósforo e potássio em misturas de plantas de cobertura de solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 2, p. 325-334, 2003.

KAWAMOTO, H.; TOUNO, E.; UCHINO, H.; UOZUMI, S. Comparison of fermentation quality and ruminal degradability between two different harvest timings of forage soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) ensiled with the corn-silage system. **Grassland Science**, v. 59, n. 2, p. 120-123, 2013.

LIMA, J. A.; GAVIOLI, I. L. de C.; BARBOSA, C. M. P.; BERNDT, A.; GIMENES, F. M. de A.; PAZ, C. C. de P.; CUNHA, E. A. Soybean silage and sugarcane tops silage on lamb performance. **Ciência Rural**, v.43, n.8, p.1478-1484, 2013.

MCDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERSON, S. **The biochemistry of silage**. 2 ed. Marlow, Chalcombe, USA, 1991.

MELLO FILHO, O. L. **Avaliação de variedades e progênies de soja para produção de silagem**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 72.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY, G.C.; COLLINS, M. Jr.; MERTENS, D.R.; MOSER, L.E. (eds). **Forage Quality, Evaluation, and Utilization**, Madison, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Wisconsin, 1994. Cap. 11, p. 450-493.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; GALYEAN, M. L.; VASCONCELOS, J. T. Snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animals Science**, v. 87, n. 10, p. 3427-3439, 2009

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7 ed. Washington, DC, 2001. p. 381.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. 8 ed. Washington, DC, 2016. p. 494.

NI, K.; WANG, F.; ZHU, B.; YANG, J.; ZHOU, G.; PAN, Y.; TAO, Y.; ZHONG, J. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. **Bioresource Technology** v. 238, p. 706-715, 2017.

NKOSI, B. D.; MEESKE, R.; LANGA, T.; MOTIANG, M. D.; MOODIBA, S.; MKINZE, N. R.; GROENEWALD, I. B. Effects of ensiling forage soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) with or without bacterial inoculants on the fermentation characteristics, aerobic stability and nutrient digestion of silage by Damara rams. **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 90-96, 2016.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 589–96, 1999.

OLIVEIRA, R. D.; SILVA, C. M.; MIELERSKI, F.; LIMA, J. S. B.; EDVAN, R. L. Harvest growth stages in soybean cultivars intended for silage. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 4, p. 383-387, 2016.

OLIVEIRA, A. S.; WEINBERG, Z. G.; OGUNADE, I. M.; CERVANTES, A. A. P.; ARRIOLA, K. G.; JIANG, Y.; KIM, D.; LI, X.; GONCALVES, M. C. M.; VYAS, D.; ADESOGAN, A. T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4587-4603, 2017.



PARRA, C. S.; BOLSON, D. C.; JACOVACI, F. A.; NUSSIO, L. G.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P.; Influence of soybean-crop proportion on the conservation of maize-soybean bi-crop silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 257, p. 114295, 2019.

PINTO, A. C. J; MILLEN, D. Nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists: the 2016 Brazilian survey. **Canadian Journal of Animal Science**. v. 99, n. 2, p 392-407, 2019.

PROTES, V. M.; COSTA, C.; PARIZ, C. M.; CASTILHOS, A. M.; MEIRELLES, P. R. L.; LONGHINI, V. Z.; ROÇA, R. O.; RICARDO, H. A.; MELO, V. F. P.; Effects of soybean silage on feeding behavior, performance, and meat quality of lambs. **Small Ruminant Research**. v. 164, p. 64-69, 2018.

RIGUEIRA, J. P. S.; PEREIRA, O. G.; FILHO, S. C. V.; RIBEIRO, K. G.; GARCIA, R.; CEZÁRIO, A. C. Soybean silage in the diet for beef cattle. **Acta Scientiarum**, v. 37, n. 1, p. 61-65, 2015.

ROSA, L. O.; PEREIRA, O. G.; RIBEIRO, K. G.; VALADARES, F. S. C.; CECON, P. R. Fermentation profile and microbial population in soybean silage with inoculant and powdered molasses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1586-1594, 2018.

ROTZ, C. A.; FORD, S. A.; BUCKMASTER, D. R. Silage in Farming Systems. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E.; HARRISON, J. H. (Eds). **Silage Science and Technology**. Madison, American Society of Agronomy. Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 2003. cap. 11, p. 505-546.

SANTOS, G. A. A.; MOITINHO, M. R; SILVA, B. O.; XAVIER, C. V.; TEIXEIRA, D. B.; CORÁ, J. E.; LA SCALA JUNIOR, N. Effects of long-term no-tillage systems with different succession cropping strategies on the variation of soil CO<sub>2</sub> emission. **Science of the Total Environment**, v.686, p. 413-424, 2019.

SILVA, G. H. **Silagens de soja e milho na alimentação de bovinos de corte**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2010. p. 44.

SILVA, D. P.; PEDROSO, A. M.; PEREIRA, M. C. S.; BERTOLDI, G. P.; WATANABE, D. H. M.; MELO, A. C. B.; MILLEN, D. D. M. Survey of management practices used by brazilian dairy farmers and recommendation provided by 43 dairy cattle nutritionists. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 99, n. 4, p. 1-44, 2019.

SPANGHERO, M.; ZANFI, C.; SIGNOR, M.; DAVANZO, D.; VOLPE, V.; VENERUS, S. Effects of plant vegetative stage and field drying time on chemical composition and in vitro ruminal degradation of forage soybean silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 200, n. 1, p 102-106, 2015.

STELLA, L. A.; PERIPOLLI, V.; PRATES, E. R.; BARCELLOS, J. O. J. Chemical composition of corn and sorghum silage with inclusion of whole-plant soybeans. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, p. 73-79, 2016.

TOBÍA, C.; VILLALOBOS, E.; ROJAS, A.; SOTO, H.; MOORE, K. J. Nutritional value of soybean (*Glycine max* L. Merr.) silage fermented with molasses and inoculated with *Lactobacillus brevis*. **Livestock Research for Rural Development** v. 20, n. 7, p. 1-11, 2008.

VARGAS-BELLO-PEREZ, E.; MUSTAFA, A. F.; SEGUIN, P. Effects of feeding forage soybean silage on milk production, nutrient digestion, and ruminal fermentation of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 229-235, 2008.

XAVIER, C. V.; MOITINHO, M. R.; TEIXEIRA, D. B.; SANTOS, G. A. A.; BARBOSA, M. A.; MILORI, D. M. B. P.; RIGOBELLO, E.; CORÁ, J. E.; LA SCALA JUNIOR, N. Crop rotation and succession in a no-tillage system: Implications for CO<sub>2</sub> emission and soil attributes. **Journal of Environmental Management**, v. 245, p. 8-15, 2019.

ZHAI, G.; SHEN, Y.; ZHAI, Y.; LIU, X.; JIANG, H. Forage yield performance and nutritive value of selected wild soybean ecotypes. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 88, n. 3, p. 465-472, 2013.

## 2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA EM DIFERENTES ESTÁDIOS FENOLÓGICOS

### 2.1 RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito do estágio fenológico (EF) sobre o potencial produtivo, composição morfológica e composição bromatológica da planta inteira de soja (PS) e o perfil de fermentação e bromatológico da silagem de planta inteira de soja (SS). A primeira etapa foi realizada em delineamento inteiramente casualizado avaliando os efeitos dos EF R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8 sobre as variáveis de potencial produtivo, composição morfológica e composição bromatológica dos componentes da PS. A segunda etapa foi realizada com delineamento em blocos completamente casualizados em que os efeitos dos EF R3, R4, R5, R6 e R7 foram avaliados sobre as variáveis de perdas, perfil de fermentação, composição bromatológica e estabilidade aeróbica da SS. As unidades experimentais da segunda etapa foram blocadas de acordo com a combinação do uso ou não de melaço em pó e inoculante microbiano. A proporção de folha reduziu e as de colmo e vagem aumentaram na PS com o avanço do EF. O avanço do EF aumentou na PS os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), reduziu carboidratos não fibrosos (CNF) e apresentou maiores valores em R4, R5 e R6 para fibra em detergente neutro (FDN) e R3, R4 e R5 para fibra em detergente ácido (FDA). A ensilagem nos EF R6 e R7 reduziu as concentrações de ácido acético, ácido láctico e etanol bem como a capacidade tampão e aumentou a concentração de nitrogênio amoniacal na SS. A concentração de ácido butírico reduziu com o avanço do EF apresentando menores teores em R5, R6 e R7. Não foi observado efeito do EF sobre valores pH. O avanço do EF aumentou os teores de MS, MO, PB e EE com maiores valores observados em R7, reduziu os teores de FDA e CNF com menores valores observados em R7 e tendeu a reduzir as concentrações de FDN e lignina da SS. O maior desaparecimento ruminal da MS e FDN em 96 h foi observada em R7. Apesar de não haver quebra de estabilidade aeróbica até 138 h, o estágio R3 apresentou maior temperatura média após exposição ao ar em relação aos demais EF. Os EF R6 e R7 apresentaram melhor combinação entre potencial de produção, perfil de fermentação e maior fração digestível dentre os EF avaliados neste estudo sendo recomendados para ensilagem da PS.

**Palavras chave:** Composição bromatológica. Morfologia. Ponto de colheita. Silagem de planta inteira de soja.

## 2.2 ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of phenological stage (ST) on forage mass yield, morphological characterization and chemical compositions of whole-plant soybean (WPS), fermentation profile and chemical composition of whole-plant soybean silage (SS). The first step was carried out in a complete randomized design to evaluate the effect of R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, and R8 ST on forage mass yield, morphological characterization and chemical compositions of botanic compounds and WPS. The second step was carried out in a complete randomized block design to evaluate the effects of R3, R4, R5, R6, and R7 ST on losses, fermentation profile, chemical composition and aerobic stability of SS. The experimental units from second step were blocked by the combination of the use or not of microbial inoculation and molasses. The proportion of leaves was reduced while stalk and pod proportions were increased on WPS with increasing ST. Increasing PS increased dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), and ether extract (EE) contents, decreased non fiber carbohydrates (NFC) content and showed higher neutral detergent fiber (NDF) content at R4, R5, and R6 along with acid detergent fiber (ADF) content at R3, R4, and R5 ST. Ensiling at R6 and R7 decreased acetic and lactic acids, and ethanol contents as well as buffering capacity and increased ammonia nitrogen content of SS. Butyric acid content was decreased with increasing ST with lower value at R5, R6, and R7. There was no ST effect on SS pH values. Increasing ST increased DM, OM, CP, and EE contents with highest values at R7, decreased ADF and NFC contents with lowest values at R7 and tended to decrease NDF and lignin contents of SS at R5 and R7 respectively. The highest DM and NDF in situ disappearance were observed at R7. Despite no aerobic stability broken was observed up to 138 h, R3 ST showed higher temperature through air exposition compared to others. The ST R6 and R7 are recommended for WPS ensiling due to the best combination among forage mass yield, fermentation profile and higher digestible fraction among evaluated ST in the present study.

**Keywords:** Chemical composition. Harvest timing. Morphology. Whole-plant soybean silage.

### 2.3 INTRODUÇÃO

Os primeiros registros do uso da planta inteira de soja (PS) na nutrição de ruminantes data no início dos anos 90 na forma de pastejo quando intempéries climáticas afetavam a qualidade e/ou produtividade de grãos e a lavoura era destinada ao consumo animal (COFFEY et al., 1995), pois à época, ainda não se considerava a produção de silagem de planta inteira de soja (SS) uma forma alternativa de uso da PS para grão. Coffey et al. (1995) sugeriram aguardar até o estágio fenológico (EF) R6 para tomar a decisão entre utilizar a lavoura de soja para grãos, produção de feno ou silagem. Limitadas pesquisas da época demonstraram o potencial do uso da soja como forragem. Hintz et al. (1992) reportaram uma produção de massa verde na ordem de 2,4 a 7,4 toneladas de matéria seca (MS)/hectare (ha) dependendo do EF no momento da colheita. Os autores concluíram, que quando colhidas em R7 (mais de 50% das folhas apresentando coloração amarela e pelo menos uma vagem fisiologicamente madura) as PS apresentam qualidade similares a alfafa quando colhida no início da floração.

A partir de então, diversos estudos foram conduzidos com intuito de definir o EF ideal para ensilagem da PS e o seu efeito sobre o potencial produtivo e composição bromatológica da silagem. Características agrônomicas (híbrido e ciclo de produção), de cultivo (densidade populacional e espaçamento entre linhas) e climáticas, afetam a produtividade de MS da PS (SHAEFFER et al., 2001; SEITER et al., 2004; DIAS et al., 2010; PEIRETTI et al., 2017), demonstrando que os resultados são inerentes a inúmeros fatores e que devem ser avaliados caso a caso.

Embora tendo encontrado maiores produções de proteína bruta (PB) nos EF R4 e R5, Rezende et al. (2011) sugeriram que a ensilagem no R4 seria vantajosa em função da liberação antecipada da área e possibilidade de utilização desta para novas culturas. Sem considerar a produtividade por área, Peiretti et al. (2017) estudaram o efeito do EF (vegetativo V5 e V6; reprodutivo R1 a R5) sobre a composição bromatológica e o perfil de ácidos orgânicos da SS e concluíram que o estágio R5 (maior EF avaliado no estudo) seria o momento indicado para ensilagem da PS. Contudo, em estudo com dois experimentos sequenciais, Dias et al. (2010) já haviam sugerido que em função da variabilidade climática encontrada entre os anos de avaliação, os EF mais indicados para colheita e ensilagem da PS fossem R5 e R6.

A composição morfológica da planta bem como a composição bromatológica são fatores fundamentais para entender o impacto dos diferentes EF sobre o perfil bromatológico das SS (SPANGHERO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016). Oliveira et al. (2016) demonstraram que embora o peso médio de PS nos EF R4 e R6 sejam similares, a proporção entre folhas e vagens

foram distintas entre elas sugerindo a ensilagem no estágio R6 em função da maior concentração de PB.

Kawamoto et al. (2013) ao avaliarem apenas dois EF no momento da ensilagem de PS demonstraram haver diferenças na composição bromatológica, perfil de fermentação e degradabilidade ruminal da MS e PB, sugerindo que o EF R7 deveria ser o ponto de colheita da PS para ensilagem em detrimento ao R6, um vez que este apresentou maior capacidade de preservação da proteína.

Em função da variabilidade dos resultados disponíveis torna-se difícil estabelecer o EF ideal para colheita da PS para ensilagem, visto que nenhum estudo até o momento, comparou características de produtividade e morfológicas da PS, perfil de fermentação e bromatológico da SS num mesmo contexto. Por isso o objetivo do presente estudo foi determinar o efeito do EF sobre o potencial produtivo, composição morfológica e bromatológica da PS e o perfil de fermentação, composição bromatológica e estabilidade aeróbica da SS. A hipótese criada, foi de que a qualidade da SS melhore a medida que aumenta o EF no momento da ensilagem.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1 Estabelecimento da cultura

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em Pirassununga/SP localizado a 21° 58' 19.8" Sul e 47° 28' 15.9" Oeste e altitude média de 620 m. O clima da região, segundo a classificação de Köppen – Geiger (ALVARES et al., 2013), é do tipo subtropical úmido (Cwa), com precipitação anual média de 1.200 mm.

Em um campo experimental de 7 ha foi estabelecido a cultura da soja com o híbrido Agroeste® 3610 I PRO (Xanxerê, Santa Catarina, Brasil). O plantio foi realizado na segunda quinzena de outubro de 2016, utilizando uma densidade de semeadura de 320.000 sementes por hectare, em espaçamento de 0,45 m entre linhas e adubação de base constituída de 450 kg/ha, da formulação 2-20-10 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O). O manejo fitossanitário foi realizado mediante laudo técnico da lavoura, monitorada quanto ao aparecimento de doenças e ataque de pragas, durante todo o ciclo da cultura.

Dentro do campo experimental foram estabelecidos 5 plots para amostragem. A determinação dos EF foi de acordo com a metodologia proposta por Fehr e Caviness (1977) classificadas em: R1 início do florescimento; R2 pleno florescimento; R3 início da formação

da vagem; R4 vagem formada; R5 início da formação da semente; R6 semente cheia; R7 início da maturidade; e R8 maturidade fisiológica. A amostragem em cada EF aconteceu quando no mínimo 50 % das plantas em cada plot apresentou características visuais do EF. O tempo em dias relativos ao plantio necessários para alcançar esse objetivo está apresentado na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Dias relativos ao plantio para lavoura atingir o cada estágio fenológico.

Estádio fenológico <sup>1</sup>	Dias após o plantio	Altura da planta (cm)
R1	59	94,8
R2	64	105
R3	71	107
R4	79	110
R5	90	116
R6	113	120
R7	124	114
R8	130	114

<sup>1</sup>De acordo com Fehr e Caviness (1977).

#### 2.4.2 Caracterização morfológica, composição bromatológica e potencial de produção

Para as variáveis de potencial produtivo e composição morfológica e bromatológica da PS, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado considerando os EF de R1 á R8 como tratamentos e os 5 plots como unidades experimentais.

Em cada EF 10 plantas de cada plot foram manualmente colhidas linearmente a 5 cm de altura em relação ao solo e categorizadas entre folha, caule, vagem e inflorescência, obtendo uma amostra composta de cada componente botânico por plot. As amostras compostas foram pesadas e calculado sua proporção em relação a soma de todos os componentes. Uma fração de cada amostra composta foi pré-seca em estufa de ventilação forçada à 55° C, por 72 horas para análises bromatológicas. Posteriormente foram moídas em moinho de facas tipo Willey em peneiras de 1 e 2 mm. Amostras moídas a 1 mm foram analisadas quanto aos teores de MS (método 930.15; AOAC, 2000), PB (N × 6,25; método Kjeldahl 984.13; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC, 2000), matéria mineral (MM; método 942.05; AOAC, 2000), FDN e FDA pelo método sequencial (VAN SOEST, 1991), usando alfa-amilase e sulfito de sódio (UNDERSANDER et al., 1993). O teor de carboidratos não-fibrosos (CNF) foi calculado de acordo com Hall (2000), onde:  $CNF (g/kg) = 1.000 - (PB + EE + MM + FDN)$ .

Amostras de cada componente moídas a 2 mm foram acondicionadas em sacos de TNT de porosidade com aproximadamente 50 µm e dimensões de 5 x 5 cm (CASALI et al., 2008; < 20 mg de MS/cm<sup>2</sup>; NOCEK, 1988) e incubadas em quadruplicatas, no rúmen de duas vacas

canuladas no rúmen previamente adaptadas a dieta basal (500 g/kg MS de silagem de milho como volumoso) por um intervalo de 96 horas. Após o período de incubação os sacos foram manualmente lavados em água fria corrente, até o total clareamento, o resíduo analisado quanto ao teor de MS conforme método previamente descrito e a média dos 4 saquinhos considerado para análise estatística.

Em cada plot foi quantificado em uma avaliação no estágio R1, o número de plantas em 10 metros lineares. A média obtida a partir dos 5 plots foi considerada para estimativa da densidade populacional (plantas/ha). O produto da proporção dos componentes botânicos na PS e seus respectivos perfis bromatológicos, foram considerados para calcular a média ponderada da composição bromatológica da planta.

O potencial de produção estimado [expressa em kg de MS e matéria natural (MN)/ha] foi calculada através do produto entre o peso médio da PS em cada plot e a densidade populacional média do campo experimental.

### 2.4.3 Ensilagem

Para as variáveis relacionadas a SS, foi utilizado delineamento em blocos completamente casualizados considerando 5 EF (R3, R4, R5, R6 e R7) como tratamentos e ausência do uso de aditivos, adição de 40 g/kg de MN de melaço em pó, adição de inoculante bacteriano [ $10^5$  UFC/g de MN de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* (Silobac<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca)] e associação de ambos os aditivos como efeito de blocagem (4 blocos).

Aproximadamente 30 kg de MN de plantas por plot foram amostrados de forma manual a 5 cm da superfície do solo sempre às 13:00 horas em cada EF. As plantas oriundas dos 5 plots foram trituradas em picador estacionário alcançando um tamanho médio de partícula de  $2,4 \pm 0,5$  cm (Penn State Particle Separator; HEINRICHS; KONONOFF, 2013) e a massa verde picada foi homogeneizada obtendo uma massa de forragem composta em cada EF. O melaço foi aplicado sobre o material picado, misturado manualmente, enquanto que o inoculante microbiano foi diluído em água (1g/L) e pulverizado sobre o material picado na dose de 2 ml da diluição/kg de MN. As amostras foram então acondicionadas em mini silos (10/bloco/tratamento) confeccionados em tubos de policloreto de vinila (PVC) com dimensões de 0,5 m de comprimento e 0,1 m de diâmetro. A densidade específica utilizada foi de 650 kg de MN/m<sup>3</sup> (2,4 kg por silo) e ao final do processo, os silos foram vedados com uma lona de polietileno de 200 µm de espessura (Superlona<sup>®</sup> preta/branca, Electro Plastic, Varginha, Brasil), pesados e armazenados por 90 dias.



#### 2.4.4 Avaliação de perdas e recuperação de matéria seca

A perda fermentativa total (PT) foi determinada pela soma das perdas por gás (PG) e efluente (PE). Após 90 dias de ensilagem, os silos experimentais foram pesados para determinação da PG através da seguinte equação:

$$PG \left( \frac{g}{kg} \right) = \frac{PSCe (g) - PSCa (g)}{MSe (kg)},$$

onde PG é a perda por gás (g/kg de MS), PSCe é o peso do silo cheio no momento da ensilagem (g), PSCo é o peso do silo cheio no momento da abertura (g) e MSe é a MS ensilada (kg).

A perda por efluente foi determinadas pela seguinte equação:

$$PE \left( \frac{g}{kg} \right) = \frac{PSVa (g) - PSVe (g)}{MSe (kg)},$$

onde a PE é a perda por efluente (g/kg de MS); PSVa é o peso do silo vazio no momento da abertura (g) e PSVe é o peso do silo vazio no momento da ensilagem (g).

A recuperação de MS (RMS) foi calculada como a razão entre a MS no momento da abertura (MSa; g) e MSe (kg):

$$RMS(g/kg) = MSa (g)/MSe (kg).$$

Para minimizar o impacto de compostos voláteis nos cálculos de perdas, as silagens foram secas em 55 °C, por 72 horas.

#### 2.4.5 Perfil de fermentação

Quando abertos o conteúdo de 10 cm superior de cada mini silo foi descartado. O restante foi homogeneizado, amostrado para análise bromatológica e o excedente congelado até avaliação de estabilidade aeróbica de todos os EF simultaneamente. Uma amostra de 15 g foi homogeneizada com 250 mL de água destilada em liquidificador por 30 segundos e o extrato aquoso avaliado quanto ao pH e capacidade tampão (CP) por meio de um phmetro (MB-10, Marte Científica®, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). Para determinação da CP, o extrato aquoso foi titulado para pH 4,0 com HCl (0,1 N) e posteriormente titulado com NaOH (0,1 N) para pH

6,0 e o resultado expresso em miliequivalentes (meq) de base requerida para elevar o pH de 4,0 para 6,0 em cada 100 g de MS (PLAYNE; MCDONALD 1996).

Alíquotas do extrato aquoso foram centrifugadas ( $2.000 \times g$  por 15 min.) e 1,6 mL do sobrenadante foi acondicionado em eppendorff (4:1 v/v) contendo 0,4 mL de ácido ortofosfórico (20%) e congeladas até a determinação de ácidos orgânicos (acético, propiônico, butírico e de cadeia ramificada) e etanol. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante foi congelada para análise de ácido láctico de acordo com Pryce (1969). Uma alíquota de 0,9 mL do sobrenadante foi acondicionado em eppendorff contendo 450  $\mu$ L de ácido sulfúrico (1 N), para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) pelo método colorimétrico hipoclorito-fenol (BRODERICK; KANG, 1980) e absorbância medida por leitor de microplaca (Biochrom Asys Microplate Reader, Biochrom®, Holliston, EUA).

Ácidos orgânicos e etanol foram determinados por cromatografia gasosa (Shimadzu® GC-2014 Plus, Kyoto, Japan) em cromatógrafo equipado com injetor automático (AOC-20i a 300°C), coluna de vidro capilar (Stabilwax-DA™; 30 m de comprimento e 0,25 mm d.i Restek®, Bellefonte, EUA) e detector de ionização de chama usando hélio como gás de arraste, velocidade linear de 42 cm<sup>3</sup>/s e uma corrida cromatográfica de 11,5 min. Com temperatura inicial da coluna de 40 °C a rampa de aquecimento seguiu aumento de 40 para 120 °C com taxa de 40 °C/min, seguida de 120 para 180 °C, a 10 °C/min e de 180 para 240 °C, a 120 °C/min, mantendo a temperatura de 240 °C por 3 min, até o final da corrida. A análise dos picos foi realizada por meio do software GCsolution (v.2.42.00; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

#### **2.4.6 Composição bromatológica e desaparecimento ruminal *in situ* da silagem de planta inteira de soja**

Amostras de SS foram pré secas em estufa de ventilação forçada à 55 °C, por 72 horas e moídas em moinho de facas tipo Willey (peneira de 1 e 2 mm). Amostras moídas a 1 mm foram analisadas quanto aos teores de MS, PB, EE, lignina, MM, FDN, FDA e CNF enquanto que aquelas moídas a 2 mm foram analisadas quando ao desaparecimento ruminal *in situ* da MS e FDN em 96 h. O procedimento de incubação seguiu o protocolo previamente descritos no item 2.4.2 Caracterização morfológica, composição bromatológica e potencia de produção, com adição da análise de FDN no resíduo de incubação.

### 2.4.7 Estabilidade aeróbica

Amostras de SS foram mantidas congeladas (FERRARETTO et al., 2017) até a avaliação de estabilidade aeróbica de forma simultânea com amostras de todos os EF. Estas foram então descongeladas e agrupadas duas-a-duas para obter amostra suficiente para ocupar a altura de 30 cm de SS em um balde plástico. Esse material foi exposto ao ar por 138 h em um ambiente de temperatura controlada ( $24 \pm 1,8$  °C). Por meio de *data loggers* (USB Electronic data Tag Temp Stick, Novus®, Canoas, Brasil) posicionados a 15 cm de altura no centro da massa do balde e no chão do local onde os baldes foram posicionados, a temperatura da massa exposta e do ambiente respectivamente foram automaticamente obtidas em intervalos de 1 hora. A estabilidade aeróbica foi considerada como o tempo em horas necessário para a temperatura da SS alcançar 2 °C a cima da temperatura ambiente (KUNG JR, 2010).

### 2.4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo PROC MIXED do SAS 9.4 (Statistical Analyses for Windows - Institute Inc., Cary, EUA). Variáveis de potencial de produção, caracterização morfológica e bromatológica da PS foram analisadas considerando o efeito fixo de EF (R1 à R8). Para as variáveis associadas a SS, os dados foram analisados considerando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + E_i + b_j + e_{ij},$$

em que  $b_j \approx N(0, \sigma_b^2)$  e  $e_{ij} \approx N(0, \sigma_e^2)$ ; onde,  $Y_{ij}$  é o valor da variável dependente;  $\mu$  é a média geral;  $E_i$  é o efeito fixo de EF ( $i= 1$  à  $5$ );  $b_j$  é o efeito aleatório de bloco ( $j= 1$  à  $4$ );  $e_{ij}$  é o erro experimental;  $N$  é a distribuição normal dos dados;  $\sigma_b^2$  e  $\sigma_e^2$  são variâncias associadas ao efeito aleatório de bloco e a variância residual.

Quando não houve quebra da estabilidade aeróbica os dados de temperatura foram analisados como medidas repetidas no tempo de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + b_j + \omega_{ijk} + T_l + ET_{jl} + e_{ijkl}$$

em que  $b_j \approx N(0, \sigma_b^2)$ ,  $\omega_{ijk} \approx N(0, \sigma_\omega^2)$  e  $e_{ijkl} \approx MVN(0, R)$ ; onde:  $Y_{ijkl}$  é o valor da variável dependente;  $\mu$ ,  $E_i$ ,  $b_j$  e  $N$  foram previamente descritos;  $\omega_{ijk}$  é o erro associado a unidade experimental;  $T_l$  é o efeito fixo de tempo ( $l = 1$  à  $24$ );  $ET_{jl}$  é o efeito fixo de interação;  $\sigma_\omega^2$  é a

variância residual associada com a silagem em cada tempo de amostragem; MVN é a distribuição multivariada, e R é a matriz de covariância dos resíduos em função das medidas repetidas no tempo. As matrizes de covariância testadas foram [CS, CSH, AR(1), ARH(1), TOEP, TOEPH, UN, FA(1) e ANTE(1)], e escolhidas de acordo com o critério Baesiano. Graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Kenward e Roger (1997). Significância foi declarada quando  $P < 0,05$  e tendência  $0,10 > P > 0,05$ .

## 2.5 RESULTADOS

### 2.5.1 Caracterização morfológica, composição bromatológica e potencial de produção

Houve diminuição ( $P < 0,05$ ) da proporção de folha e aumento na de vagens a medida que avançou o EF com menor proporção observada em R7 e maior em R8 respectivamente (Tabela 2.2). A proporção de colmo aumentou ( $P < 0,05$ ) até R5 e reduziu nos EF subsequentes. Efeito similar foi observado para proporção de inflorescência que aumentou ( $P < 0,05$ ) em R2 e R3, reduzindo em R4. O peso médio da PS aumentou ( $P < 0,05$ ) com avanço do EF até R5 e reduziu em R7 e R8.

Tabela 2.2 - Efeito do estágio fenológico sobre a caracterização morfológica e peso da planta inteira de soja

Item	Estádio Fenológico <sup>1</sup>								EPM	P-valor
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8		
Composição, g/kg MS										
Folha	452 <sup>a</sup>	421 <sup>b</sup>	367 <sup>c</sup>	320 <sup>d</sup>	217 <sup>e</sup>	99,0 <sup>f</sup>	22,1 <sup>g</sup>	-	9,28	<0,001
Colmo	543 <sup>a</sup>	562 <sup>a</sup>	578 <sup>a</sup>	579 <sup>a</sup>	535 <sup>a</sup>	439 <sup>b</sup>	375 <sup>c</sup>	289 <sup>d</sup>	17,0	<0,001
Vagem	-	-	34,4 <sup>f</sup>	89,7 <sup>e</sup>	248 <sup>d</sup>	462 <sup>c</sup>	603 <sup>b</sup>	711 <sup>a</sup>	16,1	<0,001
Inflorescência	4,68 <sup>c</sup>	16,9 <sup>a</sup>	20,5 <sup>a</sup>	11,5 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1,45	<0,001
Composição, g/kg MN										
Folha	346 <sup>a</sup>	326 <sup>a</sup>	296 <sup>b</sup>	246 <sup>c</sup>	152 <sup>d</sup>	82,4 <sup>e</sup>	18,6 <sup>f</sup>	-	7,67	<0,001
Colmo	649 <sup>a</sup>	658 <sup>a</sup>	653 <sup>a</sup>	638 <sup>a</sup>	548 <sup>b</sup>	464 <sup>c</sup>	430 <sup>cd</sup>	398 <sup>d</sup>	17,5	<0,001
Vagem	-	-	30,1 <sup>f</sup>	104 <sup>e</sup>	299 <sup>d</sup>	454 <sup>c</sup>	551 <sup>b</sup>	602 <sup>a</sup>	17,0	<0,001
Inflorescência	4,26 <sup>c</sup>	16,3 <sup>a</sup>	20,2 <sup>a</sup>	11,9 <sup>b</sup>	-	-	-	-	1,53	<0,001
Peso da planta, g MN	87,5 <sup>d</sup>	124 <sup>c</sup>	143 <sup>abc</sup>	161 <sup>a</sup>	162 <sup>a</sup>	158 <sup>ab</sup>	131 <sup>abc</sup>	129 <sup>bc</sup>	10,5	0,001

<sup>a-f</sup> Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>1</sup> Determinados de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977).

De maneira geral, o avanço do EF aumentou ( $P < 0,05$ ) os teores de MS, FDN e FDA da folha com maiores valores observados em R6 e R5 respectivamente, reduziu ( $P < 0,05$ ) os teores de MO e PB com menores valores observados em R6 e apresentou maior teor de CNF ( $P < 0,05$ ) em R2 (Tabela 2.3). O teor de EE da folha reduziu ( $P < 0,05$ ) a partir de R3 mantendo-

se estável até R5 apresentando maior valor em R6. Houve aumento ( $P < 0,05$ ) do teor de MS do colmo com o avanço do EF apresentando maior valor em R8. Mesmo comportamento foi observado para os teores de MO, FDN e FDA com maiores valores ( $P < 0,05$ ) em R7 e R8.

Tabela 2.3 - Efeito do estágio fenológico sobre a composição bromatológica dos componentes botânicos da planta inteira de soja (g/kg de MS)

Item	Estádio Fenológico <sup>1</sup>								EPM	P-valor
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8		
<b>MS<sup>2</sup></b>										
Folha	231 <sup>d</sup>	234 <sup>d</sup>	246 <sup>cd</sup>	260 <sup>bc</sup>	276 <sup>b</sup>	350 <sup>a</sup>	-	-	7,29	<0,001
Colmo	148 <sup>e</sup>	155 <sup>de</sup>	176 <sup>de</sup>	181 <sup>d</sup>	235 <sup>c</sup>	275 <sup>b</sup>	301 <sup>b</sup>	380 <sup>a</sup>	9,66	<0,001
Vagem	-	-	-	-	200 <sup>d</sup>	296 <sup>c</sup>	379 <sup>b</sup>	612 <sup>a</sup>	5,92	<0,001
<b>MO<sup>3</sup></b>										
Folha	920 <sup>b</sup>	927 <sup>a</sup>	925 <sup>ab</sup>	923 <sup>ab</sup>	914 <sup>c</sup>	903 <sup>d</sup>	-	-	1,81	0,001
Colmo	891 <sup>e</sup>	904 <sup>d</sup>	907 <sup>d</sup>	910 <sup>d</sup>	928 <sup>c</sup>	945 <sup>b</sup>	956 <sup>a</sup>	960 <sup>a</sup>	2,99	<0,001
Vagem	-	-	-	-	924 <sup>b</sup>	932 <sup>a</sup>	928 <sup>ab</sup>	930 <sup>a</sup>	1,45	0,017
<b>FDN<sup>4</sup></b>										
Folha	462 <sup>b</sup>	392 <sup>c</sup>	470 <sup>b</sup>	490 <sup>b</sup>	542 <sup>a</sup>	496 <sup>ab</sup>	-	-	17,2	0,001
Colmo	640 <sup>d</sup>	655 <sup>cd</sup>	646 <sup>cd</sup>	651 <sup>cd</sup>	705 <sup>c</sup>	743 <sup>b</sup>	803 <sup>a</sup>	831 <sup>a</sup>	12,4	<0,001
Vagem	-	-	-	-	464 <sup>a</sup>	454 <sup>a</sup>	381 <sup>b</sup>	409 <sup>b</sup>	13,2	0,002
<b>FDA<sup>5</sup></b>										
Folha	240 <sup>bc</sup>	222 <sup>c</sup>	240 <sup>bc</sup>	251 <sup>b</sup>	322 <sup>a</sup>	253 <sup>b</sup>	-	-	9,63	0,002
Colmo	536 <sup>d</sup>	537 <sup>d</sup>	547 <sup>d</sup>	540 <sup>d</sup>	598 <sup>c</sup>	637 <sup>b</sup>	693 <sup>a</sup>	717 <sup>a</sup>	13,1	<0,001
Vagem	-	-	-	-	275 <sup>a</sup>	257 <sup>ab</sup>	247 <sup>b</sup>	248 <sup>b</sup>	8,40	0,011
<b>PB<sup>6</sup></b>										
Folha	342 <sup>a</sup>	336 <sup>a</sup>	341 <sup>a</sup>	338 <sup>a</sup>	306 <sup>b</sup>	228 <sup>c</sup>	-	-	6,24	<0,001
Colmo	106 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	112 <sup>a</sup>	85,8 <sup>b</sup>	56,8 <sup>c</sup>	49,8 <sup>c</sup>	3,98	<0,001
Vagem	-	-	-	-	278 <sup>c</sup>	298 <sup>b</sup>	311 <sup>a</sup>	312 <sup>a</sup>	3,77	<0,001
<b>CNF<sup>7</sup></b>										
Folha	87,4 <sup>c</sup>	172 <sup>a</sup>	92,7 <sup>bc</sup>	75,5 <sup>c</sup>	48,8 <sup>c</sup>	142 <sup>ab</sup>	-	-	17,1	0,004
Colmo	143 <sup>a</sup>	125 <sup>ab</sup>	159 <sup>a</sup>	152 <sup>a</sup>	105 <sup>bc</sup>	110 <sup>bc</sup>	91,2 <sup>dc</sup>	75,6 <sup>d</sup>	9,24	<0,001
Vagem	-	-	-	-	162 <sup>a</sup>	102 <sup>b</sup>	118 <sup>ab</sup>	79,3 <sup>b</sup>	16,8	0,024
<b>EE<sup>8</sup></b>										
Folha	29,1 <sup>b</sup>	27,0 <sup>b</sup>	21,0 <sup>c</sup>	19,7 <sup>c</sup>	17,6 <sup>c</sup>	37,3 <sup>a</sup>	-	-	1,59	<0,001
Colmo	1,46 <sup>d</sup>	3,07 <sup>c</sup>	6,44 <sup>a</sup>	4,53 <sup>b</sup>	5,80 <sup>ab</sup>	6,84 <sup>a</sup>	4,81 <sup>b</sup>	2,94 <sup>c</sup>	0,46	<0,001
Vagem	-	-	-	-	28,9 <sup>c</sup>	77,10 <sup>b</sup>	122 <sup>a</sup>	127 <sup>a</sup>	3,68	<0,001
<b>Desaparecimento ruminal <i>in situ</i> da MS, 96 h</b>										
Folha	933 <sup>a</sup>	937 <sup>a</sup>	931 <sup>a</sup>	937 <sup>a</sup>	899 <sup>b</sup>	811 <sup>c</sup>	-	-	5,58	<0,001
Colmo	622 <sup>a</sup>	599 <sup>ab</sup>	571 <sup>b</sup>	569 <sup>b</sup>	488 <sup>c</sup>	433 <sup>d</sup>	375 <sup>e</sup>	306 <sup>f</sup>	14,5	<0,001
Vagem	-	-	-	-	891 <sup>b</sup>	908 <sup>ab</sup>	919 <sup>a</sup>	917 <sup>a</sup>	6,35	0,024

<sup>a-g</sup> Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>1</sup>Determinados de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977); <sup>2</sup>Matéria seca; <sup>3</sup>Matéria orgânica; <sup>4</sup>Fibra em detergente neutro; <sup>5</sup>Fibra em detergente ácido; <sup>6</sup>Proteína bruta; <sup>7</sup>Carboidrato não fibroso; <sup>8</sup>Extrato etéreo.

O avanço do EF reduziu ( $P < 0,05$ ) os teores de PB e CNF do colmo apresentando em R7 e R8 menores valores para PB e em R7 para CNF. O teor de EE do colmo aumentou ( $P < 0,05$ ) em EF intermediários com maiores valores observados em R3 e R6. Observou-se aumento

( $P < 0,05$ ) no teor de MS da vagem com maior valor observado em R8. Os teores de PB e EE da vagem em R7 e R8 foram maiores ( $P < 0,05$ ) em relação a R5 e R6. O avanço do EF reduziu ( $P < 0,05$ ) os teores de FDN e FDA da vagem com menores valores observados em R7 e R8. O teor de MO na vagem aumentou ( $P < 0,05$ ) e o de CNF diminuiu em R6 e R8. O avanço do EF reduziu ( $P < 0,05$ ) o desaparecimento ruminal *in situ* da MS em 96 h da folha e colmo com menores valores observados em R6 e R8 respectivamente e aumentou ( $P < 0,05$ ) a da vagem com maiores valores observados em R7 e R8.

O avanço do EF aumentou ( $P < 0,05$ ) os teores de MS, MO e EE na PS e reduziu ( $P < 0,05$ ) o teor de CNF com maiores e menor valores respectivamente observados em R8 (Tabela 2.4). O teor de PB ( $P < 0,05$ ) reduziu até R4 aumentando com avanço do EF apresentando maior valor em R8. O teor de FDN na PS aumentou ( $P < 0,05$ ) em R4 e R5, reduzindo em R7 e R8, enquanto que o maior valor ( $P < 0,05$ ) para o teor de FDA foi observado em R5 e o menor em R8. O desaparecimento ruminal *in situ* da MS da PS em 96 h foi menor entre EF R3 e R7 com maiores valores em R1, R2 e R8.

Tabela 2.4 - Efeito do estágio fenológico sobre a composição bromatológica e desaparecimento ruminal *in situ* da MS da planta inteira de soja (média ponderada em g/kg de MS)

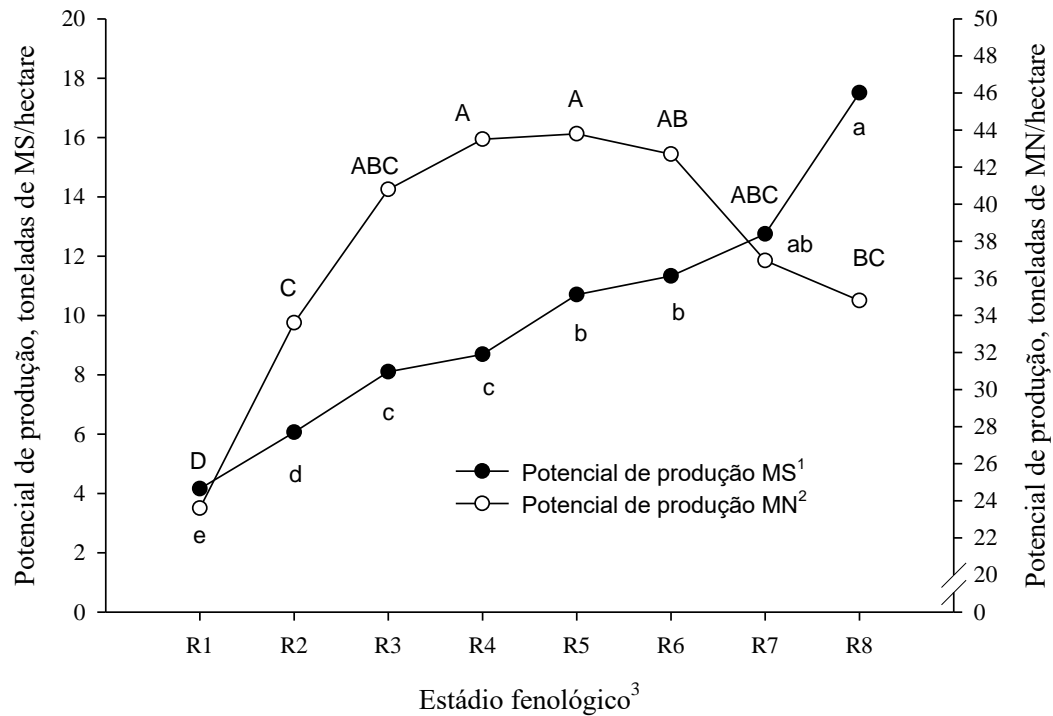
Item	Estádio Fenológico <sup>1</sup>								EPM	P-valor
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8		
MS <sup>2</sup>	185 <sup>f</sup>	189 <sup>f</sup>	204 <sup>e</sup>	216 <sup>e</sup>	253 <sup>d</sup>	292 <sup>c</sup>	354 <sup>b</sup>	529 <sup>a</sup>	4,67	<0,001
MO <sup>3</sup>	905 <sup>d</sup>	914 <sup>c</sup>	914 <sup>c</sup>	917 <sup>c</sup>	925 <sup>b</sup>	935 <sup>a</sup>	937 <sup>a</sup>	939 <sup>a</sup>	2,06	<0,001
FDN <sup>4</sup>	557 <sup>bcd</sup>	541 <sup>cd</sup>	577 <sup>abc</sup>	603 <sup>a</sup>	610 <sup>a</sup>	585 <sup>ab</sup>	541 <sup>cd</sup>	531 <sup>d</sup>	13,7	0,001
FDA <sup>5</sup>	400 <sup>cd</sup>	401 <sup>cd</sup>	423 <sup>bc</sup>	446 <sup>ab</sup>	462 <sup>a</sup>	424 <sup>bc</sup>	415 <sup>bcd</sup>	384 <sup>d</sup>	11,6	0,002
PB <sup>6</sup>	212 <sup>bc</sup>	207 <sup>bcd</sup>	196 <sup>de</sup>	185 <sup>e</sup>	192 <sup>cd</sup>	198 <sup>bc</sup>	215 <sup>b</sup>	234 <sup>a</sup>	5,65	<0,001
CNF <sup>7</sup>	122 <sup>ab</sup>	152 <sup>a</sup>	129 <sup>ab</sup>	120 <sup>b</sup>	108 <sup>bc</sup>	109 <sup>bc</sup>	104 <sup>bc</sup>	82,2 <sup>c</sup>	10,3	0,004
EE <sup>8</sup>	13,8 <sup>d</sup>	13,1 <sup>d</sup>	12,2 <sup>d</sup>	9,04 <sup>d</sup>	14,1 <sup>d</sup>	42,3 <sup>c</sup>	76,7 <sup>b</sup>	90,9 <sup>a</sup>	2,40	<0,001
DMS <sup>9</sup>	759 <sup>a</sup>	744 <sup>ab</sup>	712 <sup>bcd</sup>	702 <sup>cd</sup>	678 <sup>d</sup>	690 <sup>d</sup>	712 <sup>bcd</sup>	740 <sup>ab</sup>	13,4	0,002

<sup>a-g</sup> Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>1</sup>Determinados de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977); <sup>2</sup>Matéria seca; <sup>3</sup>Matéria orgânica; <sup>4</sup>Fibra em detergente neutro; <sup>5</sup>Fibra em detergente ácido; <sup>6</sup>Proteína bruta; <sup>7</sup>Carboidrato não fibroso; <sup>8</sup>Extrato etéreo; <sup>9</sup>Desaparecimento ruminal *in situ* da MS em 96 horas.

O avanço do EF aumentou ( $P < 0,05$ ) o potencial de produção da PS expresso em toneladas de MS/hectare com maior produção observada em R7 e R8, ao passo que o potencial de produção expressa em MN foi maximizada ( $P < 0,05$ ) entre os estádios R3 á R7 com maior valor observado em R5 (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Efeito do estágio fenológico sobre o potencial de produção da planta inteira de soja para ensilagem



<sup>a-e</sup> Médias seguidas de letras distintas diferem entre si  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>A-D</sup> Médias seguidas de letras distintas diferem entre si  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>1</sup> Potencial de produção estimado em toneladas de MS por hectare a partir do produto entre a densidade populacional estimada (277.200 de plantas/hectare) peso médio das plantas (kg de MN) e teor de MS ponderado da planta; P-valor < 0,001; EPM = 2,39.

<sup>2</sup> Potencial de produção estimado em toneladas de MN por hectare a partir do produto da densidade populacional estimada (277.200 plantas/hectare) e o peso médio da planta (kg); P-valor < 0,001; EPM = 0,599.

<sup>3</sup> Determinados de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977).

## 2.5.2 Perdas, perfil de fermentação, composição bromatológica e estabilidade aeróbica

A ensilagem da PS no estágio R7 reduziu ( $P < 0,05$ ) a PG, PE e PT sem diferir de R6 para PE e PT. A RMS foi maximizada ( $P < 0,05$ ) nos EF R6 e R7 (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 - Efeito do estágio fenológico sobre perdas e recuperação de matéria seca da silagem de planta inteira de soja (g/kg MS)

Item	Estádio Fenológico <sup>1</sup>					EPM <sup>2</sup>	P-valor
	R3	R4	R5	R6	R7		
Gás	93,9 <sup>b</sup>	89,6 <sup>b</sup>	93,7 <sup>b</sup>	106 <sup>b</sup>	70,7 <sup>a</sup>	4,07	0,006
Efluente	320 <sup>c</sup>	199 <sup>b</sup>	329 <sup>c</sup>	12,4 <sup>a</sup>	6,68 <sup>a</sup>	7,70	<0,001
Total	412 <sup>c</sup>	286 <sup>b</sup>	422 <sup>c</sup>	118 <sup>a</sup>	77,9 <sup>a</sup>	7,95	<0,001
RMS <sup>3</sup>	767 <sup>b</sup>	749 <sup>b</sup>	735 <sup>b</sup>	877 <sup>a</sup>	843 <sup>a</sup>	22,0	<0,001

<sup>a-c</sup> Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>1</sup> Determinados de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977); <sup>2</sup> Erro padrão da média; <sup>3</sup> Recuperação da MS.

A ensilagem da PS nos EF R6 e R7 reduziu ( $P < 0,05$ ) as concentrações de ácido acético, ácido láctico, etanol e CT bem como aumentou ( $P < 0,05$ ) as concentrações de ácido propiônico

e NH<sub>3</sub>-N na SS (Tabela 2.6). A concentração de ácido butírico reduziu ( $P \leq 0,05$ ) com o avanço da EF apresentando menores valores entre R5 e R7. A concentração de ácidos graxo de cadeia ramificada (AGCR) aumentaram até R5, reduzindo nos EF subsequentes apresentando menor valor em R7. O valor de pH da SS tendeu a aumentar ( $P = 0,075$ ) em R3.

Tabela 2.6 - Efeito do estágio fenológico sobre perfil de fermentação da silagem de planta inteira de soja

Item	Estádio Fenológico <sup>1</sup>					EPM <sup>2</sup>	P-valor
	R3	R4	R5	R6	R7		
Ácidos orgânicos, g/kg MS							
Acético	52,3 <sup>a</sup>	41,7 <sup>b</sup>	58,6 <sup>a</sup>	21,4 <sup>c</sup>	24,6 <sup>c</sup>	3,24	<0,001
Butírico	50,2 <sup>a</sup>	34,3 <sup>b</sup>	21,5 <sup>c</sup>	18,1 <sup>c</sup>	19,9 <sup>c</sup>	4,81	<0,001
Propiônico	7,00 <sup>c</sup>	8,46 <sup>cb</sup>	10,7 <sup>cb</sup>	18,0 <sup>a</sup>	12,8 <sup>ab</sup>	1,64	0,008
Lático	5,80 <sup>a</sup>	6,52 <sup>a</sup>	6,03 <sup>a</sup>	3,15 <sup>b</sup>	3,22 <sup>b</sup>	0,537	0,002
AGCR <sup>3</sup>	11,0 <sup>b</sup>	13,6 <sup>ab</sup>	14,2 <sup>a</sup>	6,23 <sup>c</sup>	2,36 <sup>d</sup>	2,58	<0,001
Perfil de fermentação							
NH <sub>3</sub> -N <sup>4</sup>	8,85 <sup>b</sup>	8,86 <sup>b</sup>	8,39 <sup>b</sup>	11,2 <sup>a</sup>	11,0 <sup>a</sup>	0,218	0,003
pH	5,89 <sup>x</sup>	5,39 <sup>y</sup>	5,40 <sup>y</sup>	5,41 <sup>y</sup>	5,47 <sup>y</sup>	0,117	0,075
Etanol	2,17 <sup>b</sup>	3,91 <sup>a</sup>	4,74 <sup>a</sup>	2,53 <sup>b</sup>	2,70 <sup>b</sup>	0,147	0,001
Cap. tampão <sup>5</sup>	7,32 <sup>b</sup>	7,39 <sup>b</sup>	8,66 <sup>a</sup>	5,27 <sup>c</sup>	4,39 <sup>c</sup>	0,342	<0,001

<sup>a-c</sup> Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>y-x</sup> Médias seguidas de letras distintas na linha tendem a diferir  $0,05 \leq P \leq 0,10$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>1</sup>Determinados de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977); <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Ácidos graxos de cadeia ramificada (isobutírico + isovalérico); <sup>4</sup>Nitrogênio amoniacal (% do N total); <sup>5</sup> meq. de base necessária para elevar o pH de 4 para 6/100 g de MS (Playne e McDonald 1996).

O avanço do EF aumentou ( $P < 0,05$ ) os teores de MS, MO, PB e EE com maiores valores observados em R7, reduziu ( $P < 0,05$ ) os teores de FDA e CNF com menores valores observados em R7, tendeu a aumentar ( $P = 0,099$ ) a concentração de FDN em R5 e tendeu a reduzir ( $P = 0,053$ ) a de lignina em R7 (Tabela 2.7). O desaparecimento ruminal *in situ* da MS em 96 h reduziu ( $P < 0,05$ ) com o avanço do EF até R5 onde apresentou menor valor, aumentando nos EF subsequentes com maiores valores em R3 e R7. Comportamento similar ( $P < 0,05$ ) foi encontrado para o desaparecimento ruminal *in situ* do FDN em 96 h, porém com maior valor observado em R7.



Tabela 2.7 - Efeito do estágio fenológico sobre a composição bromatológica e desaparecimento ruminal *in situ* da MS e FDN da silagem de planta inteira de soja.

Item	Estádio Fenológico <sup>1</sup>					EPM <sup>2</sup>	P-valor
	R3	R4	R5	R6	R7		
Composição bromatológica, g/kg MS							
MS <sup>3</sup>	179 <sup>d</sup>	182 <sup>d</sup>	220 <sup>c</sup>	268 <sup>b</sup>	333 <sup>a</sup>	1,43	<0,001
MO <sup>4</sup>	880 <sup>d</sup>	887 <sup>c</sup>	886 <sup>c</sup>	911 <sup>b</sup>	920 <sup>a</sup>	1,33	<0,001
FDN <sup>5</sup>	531 <sup>y</sup>	549 <sup>xy</sup>	569 <sup>x</sup>	551 <sup>xy</sup>	525 <sup>y</sup>	13,3	0,099
FDA <sup>6</sup>	449 <sup>a</sup>	459 <sup>a</sup>	485 <sup>a</sup>	437 <sup>a</sup>	378 <sup>b</sup>	14,4	0,011
PB <sup>7</sup>	155 <sup>cb</sup>	151 <sup>c</sup>	147 <sup>c</sup>	185 <sup>b</sup>	217 <sup>a</sup>	5,44	0,001
Lignina	101 <sup>x</sup>	102 <sup>x</sup>	112 <sup>x</sup>	104 <sup>x</sup>	90,0 <sup>y</sup>	3,54	0,053
CNF <sup>8</sup>	174 <sup>a</sup>	170 <sup>a</sup>	150 <sup>b</sup>	104 <sup>c</sup>	90,7 <sup>d</sup>	9,02	<0,001
EE <sup>9</sup>	18,2 <sup>c</sup>	17,1 <sup>c</sup>	20,1 <sup>c</sup>	71,1 <sup>b</sup>	88,5 <sup>a</sup>	1,88	<0,001
Desaparecimento ruminal <i>in situ</i> , 96h							
MS	588 <sup>a</sup>	568 <sup>ab</sup>	524 <sup>b</sup>	569 <sup>ab</sup>	612 <sup>a</sup>	15,4	0,014
FDN	446 <sup>b</sup>	430 <sup>b</sup>	373 <sup>c</sup>	431 <sup>b</sup>	484 <sup>a</sup>	7,53	0,005

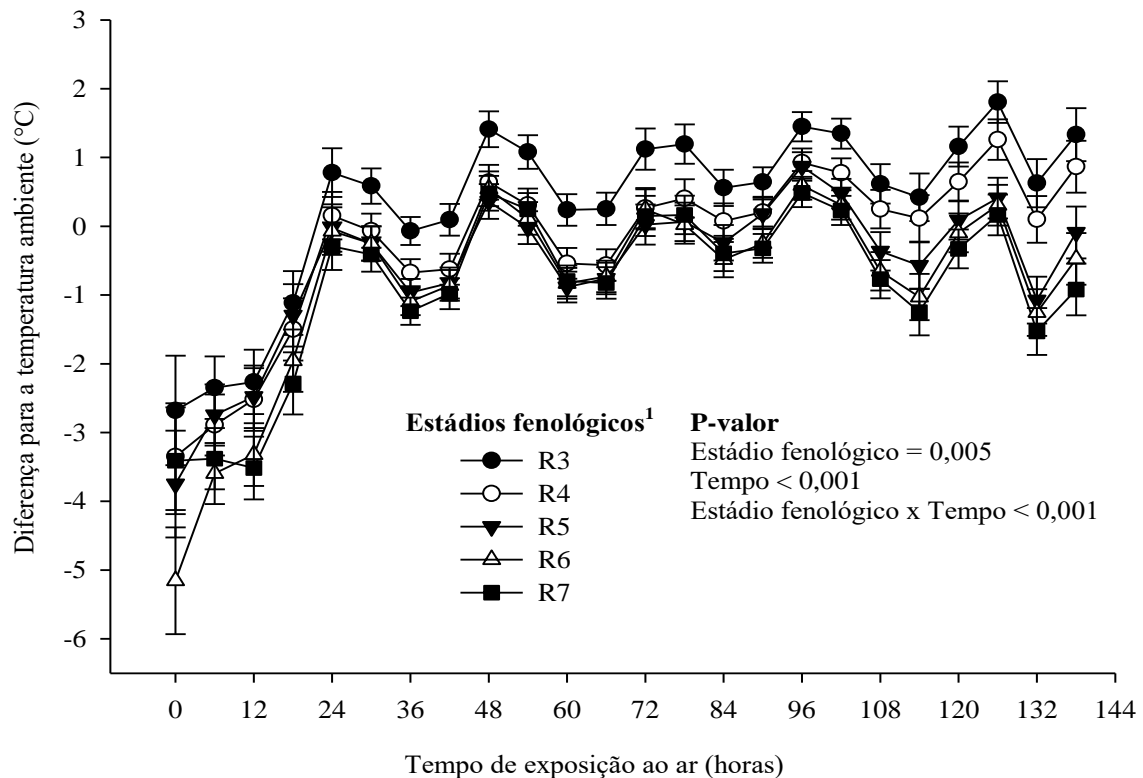
<sup>a-c</sup> Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>y-x</sup> Médias seguidas de letras distintas na linha tendem a diferir  $0,05 \leq P \leq 0,10$  de acordo com o teste LSD de Fisher.

<sup>1</sup>Determinados de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977); <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Matéria seca; <sup>4</sup>Matéria orgânica; <sup>5</sup>Fibra em detergente neutro; <sup>6</sup>Fibra em detergente ácido; <sup>7</sup>Proteína bruta; <sup>8</sup>Carboidrato não fibroso; <sup>9</sup>Extrato etéreo.

Embora a temperatura da SS aumentou ( $P < 0,001$ ) ao longo do tempo após a exposição ao ar, as silagens mantiveram a temperatura abaixo de 2 °C em relação ao ambiente, não havendo quebra de estabilidade aeróbica (Figura 2.2).

Figura 2.2- Efeito do estágio fenológico sobre a temperatura da silagem de planta inteira de soja exposta ao ar.



<sup>1</sup>Determinados de acordo com a escala de Fehr e Caviness (1977).

Temperatura ambiente considerada = 0.

O EF R3 apresentou maior ( $P < 0,05$ ) temperatura média em relação aos demais. Houve efeito de interação entre EF e tempo ( $P < 0,001$ ) em que a temperatura da SS em R3 foi superior aos demais EF a partir de 24 h não diferindo de R4 a partir de 108 h.

## 2.6 DISCUSSÃO

A composição morfológica da PS seguiu o mesmo comportamento ao longo do ciclo reprodutivo independente da unidade na qual foi expressa. Porém o peso médio da PS não acompanha o comportamento de um componente individualmente, mas sim a combinação da proporção entre eles, tornando a magnitude do efeito de EF sobre ela, dependente de fatores ligados a características agrônômicas, de cultivo e climáticos (SHAEFFER et al., 2001; SEITER et al., 2004; DIAS et al., 2010; PEIRETTI et al., 2017).

Diferentemente da composição morfológica, o comportamento do potencial de produção da soja para ensilagem muda dependendo da unidade na qual a variável é expressa. Mesmo o peso médio da PS diminuindo a partir de R5, em função do aumento no teor de MS generalizado dos componentes botânicos, o potencial de produção em toneladas de MS/ha aumenta significativamente com o avanço do EF. Contudo, embora o máximo potencial de produção de MS observado no presente estudo tenha sido em R7 e R8, a massa de forragem produzida foi majoritariamente composta por vagem (60,3 vs. 71,1% respectivamente) impactando diretamente na composição bromatológica da PS nestes estádios em função da composição bromatológica desse componente em específico.

Os teores de EE encontrados na PS em EF mais avançados ( $> R6$ ) são atípicos comparado aqueles reportados em silagens na literatura. Apesar de ainda não haver estudo que relate o efeito do teor de EE sobre a fermentação de silagens, aparentemente os teores desse nutriente encontrados em R6 e R7 não prejudicaram a fermentação da SS. A adição de óleos essenciais no processo de ensilagem de forragens tem mostrado resultados inconsistentes porém promissores no controle de microrganismos como as leveduras (KUNG JR et al., 2008; CANTOIA et al., 2020) mostrando que não apenas o teor de EE mas também o perfil desta precisa ser levado em consideração. Contudo, vale ressaltar que esses estudos avaliam silagens com a mesma composição bromatológica entre os tratamentos sendo possível isolar o efeito da adição dos óleos essenciais, fato esse que não ocorreu no presente estudo. Em função da variação dinâmica na composição da PS ao longo do ciclo reprodutivo, os efeitos do elevado teor de EE e o perfil de ácidos graxos presente nela no estádio R8 ainda precisam ser elucidados.

Gebrehanna et al. (2014) em revisão, demonstraram haver relação inversa entre a produção de efluente com o teor de MS do material ensilado. Devido ao alto teor de umidade na PS em EF iniciais (< R5), a ensilagem nos estádios R6 e R7 maximizaram a recuperação de MS comparada aos demais EF avaliados, refletindo no maior potencial de produção de SS. Esse resultado é reflexo do aumento no teor de MS individual dos componentes botânicos capitaniado pela predominância do colmo e vagem a partir de R6. Spanghero et al. (2015) relataram que o pré-emurhecimento ao sol antes da ensilagem é um método eficiente em aumentar o teor de MS da PS para ao menos 440 g/kg entre os estádios fenológicos R4 a R6. Embora existam técnicas que nos permitam aumentar o teor de MS em EF iniciais (< R5), a ensilagem precoce da PS subestima o potencial de produção de PB em função do aumento nos teores desse nutriente com o avanço do ciclo reprodutivo.

A combinação entre a composição bromatológica dos componentes botânicos e sua proporção na PS em cada EF impacta diretamente no perfil de fermentação da SS. Embora o comportamento do perfil de ácidos orgânicos seja compatível com dados da literatura considerando o teor de MS, o valor de ácido láctico é inferior ao regularmente observado para silagens de leguminosas (KUNG JR et al., 2018). Ao considerar as perdas e perfil de fermentação das silagens produzidas em estádios iniciais (< R5), os dados sugerem uma fermentação predominantemente clostrídica (QUEIROZ et al., 2018). Em condições de ensilagem com alto teor de umidade (> 700 g/kg MN) microrganismos do gênero *Clostridium* spp. aumentam sua atividade de conversão do ácido láctico em ácido butírico, apresentando silagem com alto valor de pH (KUNG JR et al., 2018). A redução da atividade desse tipo de microrganismos com o avanço do EF foi evidente no presente estudo a partir do aumento da relação ácido butírico:ácido láctico, contudo não o suficiente a ponto de apresentar diferença no valor de pH (COFFEY et al., 1995; SPANGHERO et al., 2015). Outra evidência é a redução de AGCR nos EF mais avançados, cuja presença destes na ensilagem é predominantemente oriunda da membrana lipídica de microrganismos gram positivos como o *Clostridium* spp. (KANEDA, 1991).

O aumento dos níveis de PB no material ensilado está sujeito ao aumento proporcional na proteólise e liberação de compostos básicos como NH<sub>3</sub>-N a partir da descarboxilação dos aminoácidos, contribuindo para o maior CT em silagens de leguminosas (MCDONALD et al., 1991). Porém, baseado na composição da PS entre os EF R3 e R7, o teor de PB parece não ser o fator principal associado ao aumento na CT. Embora leguminosas apresentem maior concentração de substâncias tamponantes como compostos inorgânicos e a própria PB em relação a gramíneas (KUNG JR et al., 2018), segundo Playne e McDonald (1966) durante a

ensilagem um novo sistema de tamponamento capitaniados majoritariamente pela formação de sais de ácidos orgânicos como lactato e acetato pode ser estabelecido. Ainda segundo os autores a contribuição de ânions no aumento da CT em silagem pode chegar a 88%. Assim, apesar do aumento no teor de PB com o avanço do EF predispor um aumento na CT na SS, o perfil de fermentação, associado aos teores de água e minerais são majoritariamente responsáveis pela dificuldade no abaixamento do pH como evidenciado no presente estudo, com os valores de pH acima do ideal ( $> 4$ ) para conservação de forragens em ambiente anaeróbico (MCDONALD et al., 1991) independente do EF. Embora tenha sido observado efeito do EF sobre a concentração de etanol, este encontra-se abaixo do comumente encontrado na literatura (5-15 g/kg de MS), sugerindo baixa atividade de leveduras (KUNG JR et al., 2018) na SS.

Os maiores valores de  $\text{NH}_3\text{-N}$  observados em R6 e R7 sugerem maior atividade de bactérias proteolíticas (OLIVEIRA et al., 2017). Contudo, a menor redução no teor de PB após a ensilagem nesses estádios (6,6 e 0% respectivamente) comparada aos estádios iniciais (20,9% em R3 e 18,4% em R4), sugere que a fração da PB na PS composta por nitrogênio não proteico aumenta com o avanço do EF. De acordo com os dados apresentados, a ensilagem da PS no EF R7 apresenta maior capacidade de preservação da proteína no material ensilado em relação a R6 assim como apresentado por Kawamoto et al. (2013).

A ensilagem reduz o desaparecimento ruminal *in situ* da MS da SS em comparação a PS *in natura*. Contudo quando ensilada em EF  $> R5$  a SS apresenta maior digestibilidade ruminal *in situ* da FDN em relação aos EF iniciais tendo o seu máximo índice observado em R7. Tal resultado é reflexo da ausência de efeito sobre o teor de FDN entre os EF e a redução da FDA em R7. Mesmo com redução no desaparecimento ruminal *in situ* da MS do colmo com o avanço do EF, sugere-se que o aumento da participação de FDN digestível da vagem na fração fibrosa da PS nos estádios mais avançados seja responsável por este resultado (SPANGHERO et al., 2010). Ainda, o menor valor de FDA em R7 e relação lignina:FDN (17:1) 1,9% menor comparado a média dos demais estádios avaliados, sugerem menor proporção da fração fibrosa indigestível na SS. De maneira similar, Spanghero et al. (2015) relataram aumento no desaparecimento ruminal *in vitro* da FDN da SS quando colhida em estádios fenológicos mais avançados (R6 vs R5 e R4).

A ausência da quebra de estabilidade aeróbica independente do EF, já havia sido relatada por Dias (2007) ao avaliar os mesmos EF por período mais longo do que o avaliado neste estudo (7 dias). Embora a dinâmica de aquecimento de silagens após a exposição ao ar seja complexa e varia de acordo com os perfis de microrganismos durante a fase anaeróbica e características químico-bromatológicas da silagem (WOOLFORD, 1990; WILKINSON; DAVIES, 2012), a

elevada estabilidade aeróbica é característica marcadamente conhecida em leguminosas (PAHLOW et al., 2001). Contudo é necessária cautela ao discutir essa informação, pois nem sempre essa característica é positiva, uma vez que fermentações clostrídicas durante a fase anaeróbica podem proporcionar o mesmo resultado (WOOLFORD, 1990).

A deterioração do material por microrganismos aeróbicos predominantemente por fungos e leveduras, podem ocorrer tanto pela assimilação de substratos da própria planta quanto daqueles produzidos durante o processo de conservação (WOOLFORD, 1990). Nesse contexto o balanço da presença de compostos estimuladores de crescimento de leveduras (ácido láctico) e substâncias inibidoras (ácido acético) no material ensilado exposto ao oxigênio são fundamentais no processo de perda de energia na forma de calor (MUCK et al., 2018). Contudo, em condições de pH elevado como observado neste estudo independentemente do EF, o potencial antifúngico do ácido acético reduz em função da maior presença deste na forma dissociada ( $pK_a$  4,76) (WILKINSON; DAVIES, 2012). Nota-se portanto, aumento da temperatura no EF R3 em relação aos demais seguido de R4 a partir de 108 h de avaliação. Aparentemente EF iniciais estão mais propensos ao aquecimento em função da maior concentração de ácido láctico (PAHLOW et al., 2003), maior proporção de acetato:ácido acético e maior atividade de água (WILKINSON; DAVIES, 2012).

## 2.7 CONCLUSÕES

Dentre os EF avaliados neste estudo para ensilagem da PS, R6 e R7 foram os que apresentaram melhor combinação entre potencial de produção, perfil de fermentação e maior fração digestível. Em R7 no entanto, observamos maior teor de MS da silagem associado ao maior fração fibrosa digestível ficando a decisão da escolha do ponto de colheita dependente dos objetivos estabelecidos para utilização da área e do material.

A ensilagem de PS em EF iniciais ( $< R5$ ) subestimam o potencial de produção, apresentam elevado teor de umidade na planta inteira, proporcionam uma silagem com indícios de fermentação clostrídica. Embora não avaliado o efeito do estágio R8 sobre as características de ensilagem, a composição bromatológica da PS nesse EF e o comportamento das variáveis avaliadas ao longo do ciclo reprodutivo na SS sugerem considerá-lo em estudos futuros.

## 2.8 REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA, EUA, 2000.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTHELHAS, P.C.; GONÇALVES, J. L. M.; PAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728, 2013.

BRODERICK, G. A.; KANG, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid in vitro media. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 64-75, 1980.

CANTOIA JR, R.; CAPUCHO, E.; GARCIA, T. M.; DEL VALLE, T. A.; CAMPANA, M.; ZILIO, E. M. C.; AZEVEDO, E. B.; MORAIS, J. P. G.; Lemongrass essential oil in sugarcane silage: fermentative profile, losses, chemical composition, and aerobic stability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 260, p. 114371, 2020.

CASALI, A. O.; DETTMANN, E.; VALADARES, F. S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUE, L. T.; FREITAS, S. C.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 335-342, 2008.

COFFEY, K. P.; GRANADE, P. G. V.; MOYER, J. L. Nutrient content of silage made from whole-plant soybeans. **The Professional Animal Scientist**, v. 11, p. 74-80, 1995.

DIAS, F. J. **Valor nutritivo de silagens de gramíneas de inverno com ou sem leguminosas e da planta de soja**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2007. p. 83.

DIAS, F. J.; JOBIM, C. C.; FILHO, J. L. S.; BUMBIERIS JUNIOR, V. H.; POPPI, E. C.; SANTELLO, G. A. Composição química e perdas totais de matéria seca na silagem de planta de soja. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 1, p. 19-26, 2010.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; **Stage of soybean development**. Special report 80. Co-operative Extension Service, Iowa State University, Ames, Iowa, EUA, 1977.

FERRARETTO, L. F.; GOESER, J. P.; SHAVER, R. D. Case study: Fermentation of frozen whole-plant corn silage and high-moisture corn after thawing. **The professional Animal Scientist**, v. 33, n. 4, p. 504-508, 2017.

GEBREHANNA, M. M.; GORDON, R. J.; MADANI, A.; VANDERZAAG, A. C.; WOOD, J. D. Silage effluent management: A review, **Journal of Environment Management**, v. 143, n. 1, p. 113-122, 2014.

HALL, M. B. **Calculation of Non-structural Carbohydrate Content of Feeds That Contain Non-Protein Nitrogen**, University of Florida, Gainesville, p. A-25, Bulletin 339, 2000.

HINTZ, R.W.; ALBRECHT, K. A.; OPLINGER, E. S. Yield and quality. of soybean forage as affected by cultivar and management practices. **Agronomy Journal**, v. 84, n. 5, p.795-798, 1992.

KANEDA, T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 288-302, 1991.

KAWAMOTO, H.; TOUNO, E.; UCHINO, H.; UOZUMI, S. Comparison of fermentation quality and ruminal degradability between two different harvest timings of forage soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) ensiled with the corn-silage system. **Grassland Science**, v. 59, n. 2, p. 120-123, 2013.

KENWARD, M. G.; ROGER, J. H. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, v. 53, n. 3, p. 983-997, 1997.

KUNG JR, L.; WILLIAMS, P.; SCHMIDT, R. J.; HU, W. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4793-4800, 2008.

KUNG JR, L. Aerobic stability of silage. In: CALIFORNIA ALFALFA AND FORAGE SYMPOSIUM AND CORN/CEREAL SILAGE CONFERENCE, 2010, Visalia, CA, **Proceedings...** 2010. p.14.

KUNG JR, L.; SHAVER, R. D.; GRANT, R. J.; SCHMIDT, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.

MCDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERSON, S. **The biochemistry of silage**. 2 ed. Marlow, Chalcombe, USA, 1991.

MUCK, R.E.; PITT, R.E. Aerobic losses at the silo face. **American Society of Agriculture and Engineer**, n.92, p.1003.1992.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.

OLIVEIRA, R. D.; SILVA, C. M.; MIELERSKI, F.; LIMA, J. S. B.; EDVAN, R. L. Harvest growth stages in soybean cultivars intended for silage. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 4, p. 383-387, 2016.

PAHLOW G.; R AMMER C.; SLOTTNER D.; TUORI M. Ensiling of legumes. In: WILKINS R. J.; PAUL C. (eds) **Legume silages for animal production – LEGSIL**. Landbauforschung Volkenrode, Germany, 2001, p. 27-31.

PAHLOW G.; MUCK R. E.; DRIEHUIS F.; OUDE ELFERINK S. J. W. H.; SPOELSTRA S.F. Microbiology of ensiling. In: BUXTON D. R.; MUCK R. E.; HARRISON J. H. (eds) **Silage science and technology**, Madison, American Society of Agronomy, Wisconsin, 2003. p. 31-93.

PEIRETTI, P. G.; MEINERI, G.; LONGATO, E.; TASSONE, S. Nutritive value and fatty acid content of soybean plant [*Glycine max* (L.) Merr.] during its growth cycle. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 2, p. 347-352, 2017.

PLAYNE, M. J.; MCDONALD, P. The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.17, n. 6, p. 264-268,1966.

PRYCE, J. D. A. Modification of the Barker-Summerson Method for the Determination of Latic Acid. **Analyst**, v. 94, n. 125, p.1151-1152, 1969.

QUEIROZ, O. C. M.; OGUNADE, I. M.; WEINBERG, Z.; ADESOGAN, A. T. Silage review: Foodborn pathogens in silage and their mitigation by silage additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4132-4142, 2018.

REZENDE, P. M.; GRIS, C. F.; PASSOS, A. M. A.; EVANGELISTA, A. R.; BOTREL, É. P. Cultivares e estádios de colheita no rendimento forrageiro da soja. **Revista Agrogeoambiental**, v.3, n. 1, p. 9-16, 2011.

SEITER, S.; ALTEMOSE, C. E.; DAVIS, M. H. Forage soybean yield and quality response to plant density and row distance. **Agronomy Journal**, v. 96, n. 4, p. 966-970, 2004.

SHEAFFER, C. C.; ORF, J. H.; DEVINE, T. E.; JEWETT, J. G. Yield and quality of forage soybean. **Agronomy Journal**, v. 93, n. 1, p. 99-106, 2001.

SPANGHERO, M.; BERZAGHI, P.; FORTINA, R.; MASOERO, F.; RAPETTI, L.; ZANFI, C.; TASSONE, S.; GALLO, A. Technical note: precision and accuracy of in vitro digestion of neutral detergent fiber and predicted net energy of lactation content of fibrous feeds. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4855-4859, 2010.

SPANGHERO, M.; ZANFI, C.; SIGNOR, M.; DAVANZO, D.; VOLPE, V.; VENERUS, S. Effects of plant vegetative stage and field drying time on chemical composition and in vitro ruminal degradation of forage soybean silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 200, n. 1, p 102-106, 2015.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THIEX, N. **Forage analyses procedures**. Omaha, USA, 1993, p. 154.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

WOOLFORD M. K. A review: the detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, p. 101- 116. 1990.

WILKINSON, J. M.; DAVIES, D. R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. **Grass and Forage Science**, v. 68, n. 1, p. 1-19, 2012.



### 3 EFEITO DA ADIÇÃO DE INOCULANTE MICROBIANO E MELAÇO EM PÓ NA ENSILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA

#### 3.1 RESUMO

Embora a ensilagem seja o método mais comum de preservação de forragem em sistemas de produção de ruminantes, forragens leguminosas apresentam baixo teor de carboidratos solúveis, alta capacidade tampão e umidade que podem prejudicar a fermentação. Bactérias ácido lácticas (BAL) e melaço podem se comportar como ferramentas de mitigação de tais características negativas para ensilagem de planta inteira de soja (PS). Esse estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da inoculação de BAL e adição de melaço na ensilagem da PS sobre o perfil de fermentação, perda de matéria seca (MS), composição bromatológica, desaparecimento ruminal *in situ* e estabilidade aeróbica da silagem de planta inteira de soja (SS). O experimento foi conduzido com delineamento em blocos completamente casualizado. Silos experimentais foram blocados por estágio fenológico (R3, R4, R5, R6 e R7) no momento da colheita e distribuídos em arranjo fatorial  $2 \times 2$  de tratamentos a fim de avaliar a inoculação de BAL (INO; 0 e  $10^5$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*/g de matéria natural (MN)] e adição de melaço em pó (MEL; 0 e 40 g/kg de MN) no momento da ensilagem da PS. A adição de LAB aumentou a recuperação de MS em silagens tratadas com melaço. Melaço reduziu a perda por gás, efluente e total, enquanto que INO tendeu a diminuir a perda por gás. A adição de melaço aumentou a concentração de ácido láctico, reduziu demais ácidos orgânicos, amônia (NH<sub>3</sub>-N), pH, etanol e CT. Inoculação de BAL aumentou a concentração de NH<sub>3</sub>-N ao passo que diminuiu teor de matéria orgânica (MO). Quando associado ao melaço BAL aumentou o teor de MS da silagem. Melaço aumentou a concentração de proteína bruta, carboidratos não fibrosos e diminuiu o teor de MO, fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido, lignina e extrato etéreo, além de aumentar o desaparecimento ruminal *in situ* da MS e FDN. Nenhum aditivo afetou a estabilidade aeróbica. A inoculação de BAL não mostrou efeitos positivos na SS quando não associada ao melaço, ao passo que este teve grande impacto na qualidade da SS, reduzindo perdas, melhorando o perfil de fermentação e composição química, podendo ser considerado como aditivo ao processo de ensilagem da PS.

**Palavras chave:** Aditivo. Conservação de alimento. Desaparecimento *in situ*. Silagem de leguminosa.

### 3.2 ABSTRACT

Although ensiling has been the most common method of forage preservation in ruminant feeding systems, legume forages have low water-soluble carbohydrates content, high buffering capacity, and moisture content that could impair the fermentation. Homofermentative lactic acid bacteria (LAB) and molasses could behave as a toll to mitigate negative characteristics for whole plant soybean (WPS) ensiling. This study aimed to evaluate the effects of LAB inoculation and the addition of molasses in WPS ensiling, on fermentation profile, DM losses, chemical composition, ruminal disappearance, and aerobic stability of whole-plant soybean silage (SS). The trial was performed in a completely randomized block design. Experimental silos were blocked by phenological stage at harvesting (R3, R4, R5, R6, and R7) and assigned to a  $2 \times 2$  factorial arrangement of treatments, to evaluate LAB inoculation [INO; 0 and  $10^5$  CFU (*Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*)/g fresh forage] and the addition of molasses (MOL; 0 and 40 g/kg fresh forage) on WPS ensiling. Inoculant increased DM recovery in MOL-treated silage. Molasses decreased gas, effluent, and total losses, whereas INO tended to decrease gas losses. The addition of molasses increased lactic acid and reduced other organic acids, ammonia ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), and ethanol concentration, pH, and buffering capacity. Inoculant increased  $\text{NH}_3\text{-N}$ , while decreased organic matter (OM) concentration. Inoculant in MOL-treated silage increased DM concentration. Molasses increased the concentration of crude protein, non-fiber carbohydrate, and decreased OM, neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber, lignin, and ether extract contents, besides improved ruminal disappearance of DM and NDF. None of additives affected aerobic stability. Homofermentative lactic acid bacteria did not show positive effects on SS when not associated with MOL. Whereas, MOL has a great impact on SS quality, decreasing losses improving fermentation profile, and chemical composition, can be considered in WPS ensiling as an additive.

**Keywords:** Additive. Feedstuff preservation. In situ disappearance. Legumes silage.

### 3.3 INTRODUÇÃO

Ensilagem é há décadas, o método de preservação de forragens mais comum em sistemas de alimentação de ruminantes (WEINBERG; MUCK, 1996; BERNARDES; DO RÊGO, 2014) e a sua qualidade impacta diretamente nos custos de produção e melhora o desempenho dos animais, sendo a silagem de milho a principal fonte de foragem utilizada nas fazendas leiteiras

do Brasil (BERNARDES; DO RÊGO, 2014). Entretanto, a silagem de milho apresenta baixo valor de proteína bruta [PB; 50 - 90 g/kg de matéria seca (MS)], aumentando a necessidade de fontes proteicas na dieta desses animais.

Dessa forma, a planta inteira de soja (PS) tem sido ensilada com milho (OBEID et al., 1992; BARBOSA et al., 2011; BAGHDADI et al., 2016; PARRA et al., 2019) como opção para aumentar o teor final da PB do material ensilado. Contudo, em função de limitações operacionais para confecção da silagem mista, a ensilagem individual da PS tem ganhado destaque no meio científico (NKOSI et al., 2016; NI et al., 2017; GANDRA et al., 2018).

Embora reduza linearmente o desempenho produtivo de vacas leiteiras quando incluída em até 50% do volumoso da dieta, a silagem de planta inteira de soja (SS) demonstrou capacidade de modular parâmetros ruminais e melhorar o perfil de ácidos graxos do leite sem afetar o teor de gordura (GHIZZI et al., 2020). Contudo, os efeitos negativos na performance das vacas leiteiras pode estar relacionado ao perfil de fermentação da SS, haja visto que, o baixo teor de carboidratos solúveis, alta capacidade tampão (CT) e teor de umidade no momento da colheita são desafios no processo de ensilagem desta cultura, afetando negativamente na fermentação com maior risco de proteólise, elevado teor de amônia (NH<sub>3</sub>-N) e dificuldade de abaixamento do pH produzindo uma silagem de baixa qualidade (MCDONALD et al., 1991).

Aditivos tem sido utilizados tanto isoladamente ou em associação, como ferramentas para minimizar características negativas na ensilagem de PS. De acordo com Ni et al. (2018) aumentar o teor de carboidratos solúveis para a cima de 50 g/kg de MS no momento da ensilagem é fundamental para assegurar uma condição de fermentação adequada. Ni et al. (2017) demonstraram que a adição de melão na proporção de 20 g/kg de matéria natural (MN) e inoculação de bactérias ácido lácticas (BAL; 10<sup>6</sup> UFC/g de MN) aumentaram a produção de ácido láctico e reduziram o pH da SS. Porém Tobía et al. (2008) relataram resultados positivos dose-dependentes para adição do melão até a proporção de 60 g/kg MN ensilado.

Nkosi et al. (2016) demonstraram um efeito positivo na estabilidade aeróbica e no teor de ácido láctico ao adicionarem um *blend* de BAL associado a enzimas fibrolíticas na ensilagem de PS. Segundo Gandra et al. (2018) o uso de quitosana (5 g/kg de MN) ou BAL (4,0 × 10<sup>10</sup> UFC/g de *Lactobacillus plantarum* e 2,6 × 10<sup>10</sup> UFC de *Pediococcus acidipropionici*/g de MN) aumentam a contagem de bactérias ácido lácticas e a recuperação de MS (RMS), concomitantemente com a redução da contagem de fungos e leveduras na SS.

Baseado no exposto, hipotetizou-se que a associação de BAL e melão na dose de 40 g/kg de matéria natural melhora o perfil de fermentação da SS conseqüentemente a qualidade do material produzido. Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição do

melaço em pó e inoculação de BAL na ensilagem de PS sobre perfil de fermentação, perdas, composição bromatológica, desaparecimento *in situ* e estabilidade aeróbica da SS.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Delineamento experimental e ensilagem

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em Pirassununga/SP. O estabelecimento do campo experimental, bem como informações agronômicas da cultura utilizados nesse experimento, estão descritos no item 2.4.1 Estabelecimento da cultura do capítulo 2.

Foi utilizado delineamento em blocos completamente casualizado com arranjo de tratamentos fatorial  $2 \times 2$  para avaliar a adição de melaço em pó (MEL; 0 e 40 g/kg de MN) e BAL [INO; 0 e  $10^5$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*/g de MN (Silobac<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca)]. Os silos experimentais foram blocados de acordo com o estágio fenológicos [EF; R3, R4, R5, R6 e R7 (FEHR; CAVINESS (1977))] com 10 repetições/tratamento/bloco.

Cinco plots foram delimitados do campo experimental para colheita das plantas de soja. Aproximadamente 30 kg de MN por plot foram manualmente amostrados a 5 cm da superfície do solo em cada EF sempre às 13:00 horas. As plantas oriundas dos plots foram trituradas em picador estacionário alcançando um tamanho médio de partícula de  $2,4 \pm 0,5$  cm e a massa verde picada foi homogeneizada obtendo uma amostra composta em cada EF.

Imediatamente após a picagem o melaço foi aplicado na dose de 40 g/kg de MN, misturado manualmente, enquanto que o inoculante microbiano foi diluído em água (1g/L) e pulverizado sobre o material picado na dose de 2 ml da diluição/kg do material picado. As amostras foram então acondicionadas em mini silos confeccionados em tubos de Policloreto de Vinila (PVC) com dimensões de 0,5 m de comprimento e 0,1 m de diâmetro. A densidade específica utilizada foi de 650 kg de MV/m<sup>3</sup> (2,4 kg por silo) e ao final do processo, os silos foram vedados com uma lona de polietileno de 200 µm de espessura (Superlona<sup>®</sup> preta/branca, Electro Plastic, Varginha, Brasil), pesados e armazenados por 90 dias. A composição bromatológica da PS antes da ensilagem foi considerada a partir da média dos estágios fenológicos R3, R4, R5, R6 e R7 da Tabela 2.3 do capítulo 2 (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Composição bromatológica do melaço e da planta inteira de soja antes da ensilagem (g/kg de MS)

Item	Média ± EPM <sup>1</sup>	
	Planta inteira de soja <sup>1</sup>	Melaço
Matéria seca, g/kg MN	264 ± 24,9	960
Matéria orgânica	926 ± 4,69	828
Fibra em detergente neutro	584 ± 16,5	65,6
Fibra em detergente ácido	436 ± 13,1	25,8
Proteína bruta	197 ± 7,56	32,5
Carboidratos não fibrosos	113 ± 10,9	730
Extrato etéreo	31,0 ± 12,2	nd*

<sup>1</sup>Média ± erro padrão da média dos cinco estádios fenológicos: R3 = início da formação da vagem, R4 = vagem cheia, R5 = início da formação do grão, R6 = grão cheio e R7 = início da maturidade (Fehr e Caviness 1977).

\*Não detectado.

### 3.4.2 Análises laboratoriais

As avaliações de perdas, recuperação de MS (RMS), perfil de fermentação, composição bromatológica, desaparecimento ruminal *in situ* da MS e fibra em detergente neutro (FDN) e estabilidade aeróbica da SS foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos respectivamente nos itens: 2.4.4 Avaliação de perdas e recuperação de matéria seca; 2.4.5 Perfil de fermentação; 2.4.6 Composição bromatológica e desaparecimento *in situ* da silagem de planta inteira de soja; e 2.4.7 Estabilidade aeróbica, do capítulo 2.

### 3.4.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo PROC MIXED do SAS 9.4 (Statistical Analyses for Windows - Institute Inc., Cary, EUA), considerando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + b_i + M_j + I_k + MI_{jk} + e_{ijk},$$

em que  $b_i \approx N(0, \sigma_b^2)$ ,  $e_{ijk} \approx N(0, \sigma_e^2)$ ; onde,  $Y_{ijk}$  é o valor da variável dependente;  $\mu$  é a média geral;  $b_i$  é o efeito aleatório de bloco ( $i = 1$  à  $5$ );  $M_j$  é o efeito fixo do melaço ( $j = 1$  e  $2$ );  $I_k$  é o efeito fixo do inoculante biológico ( $k = 1$  e  $2$ );  $MI_{jk}$  é o efeito fixo de interação;  $e_{ijk}$  é o erro experimental,  $N$  distribuição normal dos dados,  $\sigma_b^2$  é a variância associada ao efeito aleatório de bloco e  $\sigma_e^2$  é a variância residual.

Quando não houve quebra da estabilidade aeróbica os dados de temperatura foram analisados como medidas repetidas no tempo de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + b_i + M_j + I_k + MI_{jk} + \omega_{ijkl} + T_m + MT_{jm} + IT_{km} + MIT_{jkm} + e_{ijklm},$$

em que  $b_i \approx N(0, \sigma_b^2)$ ,  $\omega_{ijkl} \approx N(0, \sigma_\omega^2)$ , e  $e_{ijklm} \approx MVN(0, R)$ ; onde:  $Y_{ijklm}$  é o valor da variável dependente;  $\mu$ ,  $b_i$ ,  $M_j$ ,  $I_k$ ,  $MI_{jk}$ , e  $N$  foram previamente descritos;  $\omega_{ijkl}$  é o erro associado a unidade experimental;  $T_m$  é o efeito fixo de tempo ( $m = 1$  á  $24$ );  $MT_{jm}$ ,  $IT_{km}$ , e  $MIT_{jkm}$  são efeitos fixos de interação;  $\sigma_\omega^2$  é a variância residual associada com a silagem em cada tempo de amostragem;  $MVN$  é a distribuição multivariada, e  $R$  é a matriz de covariância dos resíduos em função das medidas repetidas no tempo.

As matrizes de covariância testadas foram [CS, CSH, AR(1), ARH(1), TOEP, TOEPH, UN, FA(1) e ANTE(1)], e escolhidas de acordo com o critério Baesiano. Graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Kenward e Roger (1997). Significância foi declarada quando  $P < 0,05$  e tendência  $0,10 > P > 0,05$ .

### 3.5 RESULTADOS

#### 3.5.1 Perdas fermentativas

Não houve efeito de interação entre INO e MEL ( $P \geq 0.130$ ) sobre as perdas de fermentação (Tabela 3.2). Melaço diminuiu ( $P \leq 0.016$ ) a perdas por gas (PG), perdas por efluente (PE) e perdas totais (PT), enquanto INO tendeu diminuir ( $P = 0.093$ ) PG sem afetar ( $P \geq 0.183$ ) PE e PT. Houve efeito de interação entre INO e MEL ( $P = 0.034$ ) sobre a RMS. Inoculação com BAL aumentou ( $P \leq 0.05$ ) a RMS em silagens tratadas com melaço.

Tabela 3.2 - Efeito da adição de melaço e inoculante microbiano sobre perdas e recuperação de matéria seca da silagem de planta inteira de soja (g/kg MS)

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P-valor <sup>3</sup>		
	CON	INO	MEL	IM		INO	MEL	INO×MEL
Gás	105	103	79,7	75,2	3,44	0,093	<0,001	0,322
Efluente	172	187	168	167	35,8	0,183	0,016	0,130
Total	278	285	242	241	36,4	0,585	<0,001	0,496
RMS <sup>4</sup>	716 <sup>c</sup>	711 <sup>c</sup>	867 <sup>b</sup>	884 <sup>a</sup>	15,2	0,256	<0,001	0,034

<sup>a-b</sup> Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem à  $P \leq 0,05$  de acordo com o teste LSD de Fisher para desdobramento da interação INO×MEL; <sup>1</sup> CON = Controle, INO = Inoculante ( $10^5$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*/g de MN), MEL = Melaço (40 g/kg de MN), IM = INO + MEL; <sup>2</sup> Erro padrão da média; <sup>3</sup> Efeitos da adição de inoculante microbiano (INO), melaço (MEL) e interação entre INO e MEL (INO×MEL); <sup>4</sup> Recuperação da matéria seca.

### 3.5.2 Perfil de fermentação

Não houve efeito de interação entre INO e MEL ( $P \geq 0,116$ ) sobre o perfil de fermentação (Tabela 3.3). Melaço aumentou ( $P < 0,001$ ) a concentração de ácido láctico e diminuiu ( $P < 0,001$ ) a concentração dos demais ácidos orgânicos, etanol e  $\text{NH}_3\text{-N}$ , bem como pH e CT. A inoculação de BAL aumentou ( $P = 0,019$ ) a concentração de  $\text{NH}_3\text{-N}$  sem afetar ( $P \geq 0,184$ ) a concentração dos ácidos orgânicos e etanol, pH e CT.

Tabela 3.3 - Efeito da adição de melaço e inoculante microbiano sobre perfil de fermentação da silagem de planta inteira de soja

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P-valor <sup>3</sup>		
	CON	INO	MEL	IM		INO	MEL	INO×MEL
Ácidos orgânicos, g/kg MS								
Acético	52,2	50,3	28,0	28,6	3,73	0,536	<0,001	0,235
Butírico	40,1	43,7	16,5	13,4	3,04	0,912	<0,001	0,116
Propiônico	17,2	16,7	5,64	5,78	0,937	0,647	<0,001	0,475
Láctico	3,11	3,06	7,00	6,56	0,371	0,219	<0,001	0,333
AGCR <sup>4</sup>	18,4	16,3	1,62	1,60	1,18	0,235	<0,001	0,247
Perfil de fermentação								
$\text{NH}_3\text{-N}$ <sup>5</sup>	9,82	10,2	9,16	9,43	0,303	0,019	<0,001	0,600
pH	5,92	5,91	5,13	5,08	0,051	0,471	<0,001	0,593
Etanol	3,41	3,16	3,26	3,03	0,249	0,184	<0,001	0,936
Capacidade tampão <sup>6</sup>	7,84	7,74	5,42	5,37	0,389	0,491	<0,001	0,823

<sup>1</sup>CON = Controle, INO = Inoculante ( $10^5$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*/g de MN), MEL = Melaço (40 g/kg de MN), IM = INO + MEL; <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Efeitos da adição de inoculante microbiano (INO), melaço (MEL) e interação entre INO e MEL (INO×MEL); <sup>4</sup>Ácidos graxos de cadeia ramificada (isobutírico + isovalérico); <sup>5</sup>Nitrogênio amoniacal (% do N total); <sup>6</sup> meq. de base necessária para elevar o pH de 4 para 6/100 g de MS (Playne e McDonald 1996).

### 3.5.3 Composição bromatológica e desaparecimento ruminal *in situ*

Não houve efeito de interação ( $P \geq 0,165$ ) entre INO e MEL sobre o a composição bromatológica e desaparecimento da MS e FDN da SS (Tabela 3.4). A adição de melaço aumentou ( $P < 0,001$ ) os teores de MS, PB e carboidrato não fibroso (CNF), diminuiu ( $P < 0,001$ ) os teores de matéria orgânica (MO), FDN, fibra em detergente ácido (FDA), lignina e extrato etéreo (EE) e melhorou ( $P < 0,001$ ) o desaparecimento ruminal *in situ* da MS e FDN. A inoculação com BAL aumentou ( $P = 0,003$ ) o teor de MO sem afetar ( $P \geq 0,246$ ) os demais nutrientes bem como o desaparecimento ruminal tanto da MS quanto da FDN.

Tabela 3.4 - Efeito da adição de melação e inoculante microbiano sobre a composição bromatológica e desaparecimento ruminal *in situ* da MS e FDN da silagem de planta inteira de soja.

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P-valor <sup>3</sup>		
	CON	INO	MEL	IM		INO	MEL	INO×MEL
Composição bromatológica, g/kg MS								
MS <sup>4</sup>	206	205	243	248	16,1	0,342	<0,001	0,165
MO <sup>5</sup>	901	903	890	893	3,89	0,003	<0,001	0,475
FDN <sup>6</sup>	594	594	496	497	4,23	0,878	<0,001	0,874
FDA <sup>7</sup>	489	491	394	393	9,21	0,856	<0,001	0,800
PB <sup>8</sup>	159	154	186	185	6,74	0,246	<0,001	0,448
Lignina	114	114	89,4	91,0	1,87	0,620	<0,001	0,524
CNF <sup>9</sup>	101	106	172	173	8,64	0,353	<0,001	0,589
EE <sup>10</sup>	49,3	48,5	37,1	37,2	6,74	0,714	<0,001	0,580
Desaparecimento ruminal <i>in situ</i> , 96 h								
MS	516	518	626	628	7,79	0,652	<0,001	0,982
FDN	414	405	452	459	9,63	0,933	<0,001	0,335

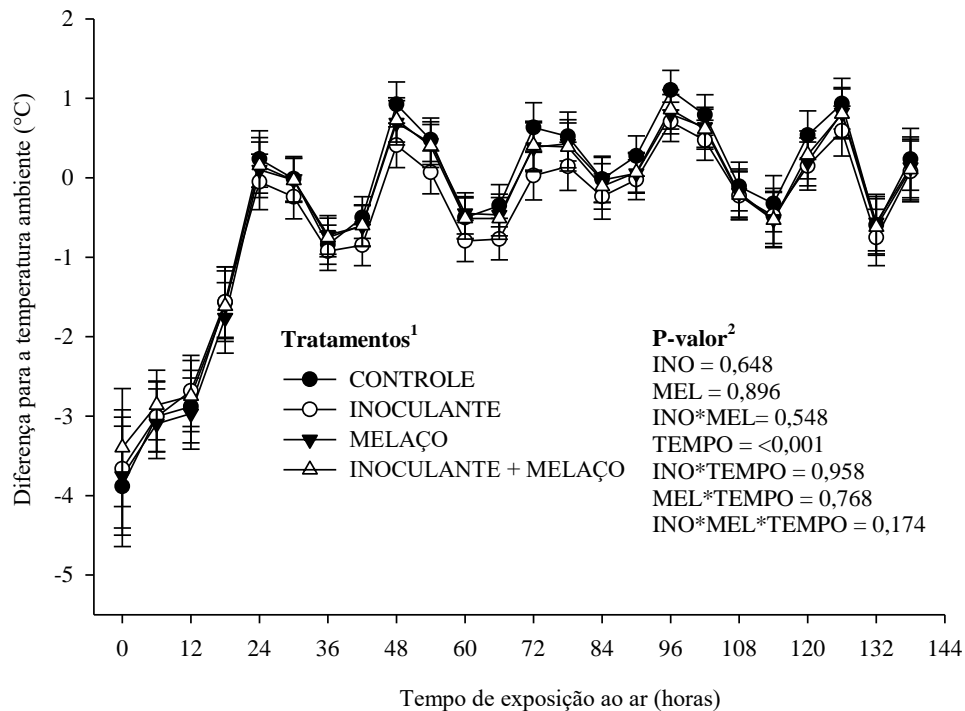
<sup>1</sup>CON = Controle, INO = Inoculante ( $10^5$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*/g de MN), MEL = Melação (40 g/kg de MN), IM = INO + MEL; <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Efeitos da adição de inoculante microbiano (INO), melação (MEL) e interação entre INO e MEL (INO×MEL); <sup>4</sup>Matéria seca; <sup>5</sup>Matéria orgânica; <sup>6</sup>Fibra em detergente neutro; <sup>7</sup>Fibra em detergente ácido; <sup>8</sup>Proteína bruta; <sup>9</sup>Carboidrato não fibroso; <sup>10</sup>Extrato etéreo.

### 3.5.4 Estabilidade aeróbica

Embora a temperatura aumentou ( $P < 0,001$ ) ao logo do tempo após a exposição ao ar, as silagens mantiveram a temperatura abaixo de 2 °C em relação a do ambiente, não havendo quebra de estabilidade aeróbica (Figura 3.1). Não houve efeito ( $P \geq 0,174$ ) de tratamento, bem como interações duplas e tripla entre INO, MEL e tempo sobre a temperatura da SS.



Figura 3.1 - Efeito da adição de melação e inoculante microbiano sobre temperatura da silagem de planta inteira de soja exposta ao ar.



<sup>1</sup>CON = Controle, INO = Inoculante ( $10^5$  UFC de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*/g de MN), MEL = Melação (40 g/kg de MN), IM = INO + MEL.

<sup>2</sup>Efeitos da adição de inoculante microbiano (INO), melação (MEL), tempo (TEMPO) e interações duplas e tripla entre INO, MEL e TEMPO.

Temperatura ambiente considerada = 0.

### 3.6 DISCUSSÃO

Apesar do esperado efeito sinérgico generalizado entre os aditivos testados, no presente estudo esse efeito somente foi observado para RMS. De maneira geral o maior teor de MS no momento da ensilagem reflete diretamente em uma maior RMS, o que as tornam variáveis relacionadas (BORREANI et al., 2018). A adição do melação pode melhorar a fermentação tanto pelo efeito físico de aumento do teor da MS inicial, quanto pelo efeito químico do aumento do teor de carboidratos solúveis (NI et al., 2017). Por outro lado, BAL podem utilizar esse carboidrato solúvel e acelerar o consumo do oxigênio inicial (THOMPSON et al., 2005), criando um ambiente anaeróbico mais rápido.

De acordo com McAllister e Hristov (2000), durante a fase anaeróbica, o oxigênio que está presente no interior do silo permite a oxidação de nutrientes gerando consequentemente a produção de efluente, gás carbônico, calor e  $\text{NH}_3\text{-N}$  livres. Entretanto, o maior teor de MS no momento da ensilagem seja pelo próprio teor do material picado em função do uso de aditivos que proporcione esse aumento (nesse estudo o melação), inibem a taxa de respiração celular

(BORREANI et al., 2018). Além disso, o maior teor de carboidratos solúveis permite uma queda mais rápida do pH evitando o crescimento de microrganismos indesejáveis (NI et al., 2017).

Ainda que em baixa concentração o aumento do teor de ácido lático associado a redução dos demais ácidos orgânicos sugerem um predomínio no perfil homofermentativo (MCDONALD et al., 1991; NISHINO et al., 2012) nas silagens tratadas com melaço mesmo sem a inoculação de BAL. Embora silagens tratadas com espécies de bactérias *L. plantarum* e/ou *Pediococcus* apresentarem menor relação entre de ácido acético e ácido lático em comparação com silagens não inoculadas (MUCK; KUNG JR, 1997), um recente estudo mostrou uma maior concentração de ácido lático em SS tratadas com melaço em relação aquelas inoculadas com BAL (NI et al., 2017). Nishino et al. (2012) observaram esse mesmo comportamento homofermentativo com a adição de 10 g/kg de melaço, sem inoculação de BAL, em gramíneas tropicais pré-emurchecidas ao sol comparado aquelas colhidas e diretamente ensiladas com menor teor de MS. Os silos criam um microambiente em que, uma vez fechados, inicia-se uma disputa por nutrientes na corrida pelo estabelecimento e domínio microbiológico (OLIVEIRA et al., 2017). Por isso, o perfil epifítico associado a planta de soja no momento da ensilagem e o baixo teor de carboidratos solúveis podem ser fatores de resistência para a colonização de BAL quando não adicionado outros aditivos estimuladores da fermentação como o melaço (NI et al., 2017; YANG et al., 2018; ROSA et al., 2018).

Os altos níveis de PB no material ensilado, aumenta a possibilidade de proteólise e liberação de compostos básicos a partir da descarboxilação dos aminoácidos contribuindo para o maior CT em silagens de leguminosas (MCDONALD et al., 1991). Contudo, o menor pH e CT em SS tratadas com melaço, podem ter contribuído para uma redução desse efeito, aumentando da conversão de açúcares em ácido lático, preservando PB e reduzindo assim produção de  $\text{NH}_3\text{-N}$  (OLIVEIRA et al., 2017). Em função da menor constante de dissociação ( $\text{pK}_a = 3,86$ ) para o ácido lático em comparação com os demais ácidos orgânicos, este ácido e o pH da silagem estão inversamente correlacionados independente do tipo de forragem ensilada (LIMA et al., 2010).

A magnitude da redução do pH sugere uma menor proliferação de bactérias heterofermentativas reduzindo a produção dos ácidos orgânicos que não o lático, bem como aqueles considerados indesejáveis (NI et al., 2017) em SS tratadas com melaço. Ainda, a redução no teor de AGCR, composto esse predominantemente encontrado na membrana de microrganismos como as do gênero *Clostridia* spp. (KANEDA, 1991), associado a redução nos

teores de ácido butírico,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , etanol em SS tratadas com melaço, está diretamente correlacionada com a menor atividade de microrganismos indesejáveis.

Em estudo meta-analítico, Oliveira et al. (2017) demonstraram menor teor de  $\text{NH}_3\text{-N}$  para silagens de leguminosas inoculadas com BAL. Entretanto, de acordo com os autores, o tipo de forragem foi o fator que mais afetou a resposta dos aditivos microbianos. Assim, em função da falta de efeitos em variáveis que indicassem uma melhora na fermentação, associado ao aumento do teor de  $\text{NH}_3\text{-N}$  em SS inoculadas com BAL, os dados do presente estudo sugerem que a inoculação com cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* aplicados na dose de  $10^5$  UFC/g não foram eficientes em evitar a atividade proteolítica na SS.

Nishino et al. (2012) sugeriram que o tempo de ensilagem prolongada (> 56 d) pode favorecer o aumento de  $\text{NH}_3\text{-N}$  em silagem de gramíneas inoculadas com *Lactobacillus plantarum*. Mesmo resultado foi observado em SS mantidas ensiladas entre 28 e 56 dias (ROSA et al., 2018). Ambos estudos sugerem que a estabilização da fase anaeróbica foi retardada em função do alto teor de umidade no momento da ensilagem. Além disso, forragens ensiladas com baixo teor de umidade (< 700 g/kg MN) são menos suscetíveis a proteólise e descarboxilação de aminoácidos por bactérias do gênero *Clostridia spp.* (SCHERER et al., 2015) apresentando maior teor de PB em SS tratadas com melaço em comparação aquelas apenas inoculadas com BAL (NI et al. 2017).

Nkosi et al. (2016) relataram que o maior teor de FDN em SS não tratadas com melaço se deve a maior perda de MS e conseqüentemente concentração deste nutriente. Efeito similar pode ser atribuído as demais frações fibrosas, CNF e EE no presente estudo. A diferença no teor de FDN encontrada entre SS tratadas ou não com melaço nesse estudo foi de 97,5 g/kg de MS, ao passo que Ni et al. (2017) reportaram uma redução na ordem de 15 g/kg de MS ao utilizarem dose 50% menor. Ainda, a adição de melaço aumentou o desaparecimento ruminal *in situ* da MS e FDN, sugerindo uma alteração da proporção dos compostos fibrosos SS. Tobía et al. (2008) demonstraram uma redução linear na celulose e lignina mas não de hemicelulose em SS tratadas com adição crescente de melaço sem diferenças entre os maiores níveis avaliados (60 e 90 g/kg de MS), sugerindo que a magnitude de redução da parede celular é dose dependente. Além disso, a proporção lignina:FDN foi menor em SS tratadas com melaço em comparação aquelas não tratadas (18,2 vs 19,1% respectivamente). Compostos inorgânicos presentes no melaço bem como aqueles potencialmente lixiviados na produção de efluente em SS inoculadas com BAL podem ter contribuído com o aumento do teor de MO em SS não tratadas com melaço.

Não houve efeito no uso de aditivos na estabilidade aeróbica no presente estudo. Está bem estabelecido na literatura que o ácido acético é um potente antifúngico e frequentemente relacionado a menor deterioração aeróbica de silagens após a exposição ao ar. (OLIVEIRA et al., 2017; MUCK et al., 2018). Contudo, embora um menor teor de ácido acético tenha sido observado em SS tratadas com melação, esta concentração parece ter sido suficiente para bloquear o crescimento de leveduras até 138 horas de exposição.

### 3.7 CONCLUSÕES

O uso de melação na dose de 40g/kg de MS na ensilagem de PS teve grande impacto positivo na qualidade da SS, uma vez que reduziu perdas oriundas da fermentação e melhorou o perfil bromatológico. Os efeitos positivos encontrados são atribuídos tanto ao efeito físico quando químico da sua adição. O efeito sinérgico entre a inoculação com BAL e adição de melação na ensilagem de PS não foi evidenciado no presente estudo. Contudo, a maior RMS em silagens tratadas com ambos aditivos e ausência de demais efeitos em silagens inoculadas sem a presença de melação, sugerem avaliação da dose de ambos aditivos em estudos posteriores.

### 3.8 REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA, EUA, 2000.
- ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTHELHAS, P.C.; GONÇALVES, J. L. M.; PAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v.22, n.6, p.711-728, 2013.
- BAGHDADI, A.; HALIM, R. A.; RADZIAH, O.; MARTINITE, M. Y.; EBRAHIMI, M. Fermentative characteristics and nutritive value of corn silage intercropped with soybean under different crop combination ratios. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1710-1717, 2016.
- BARBOSA, L. A.; REZENDE, A. V.; RABELO, C. H. S.; RABELO, F. H. S.; NOGUEIRA, D. A. Aerobic stability of corn and soybean silage mixed at different ratios. **Ars Veterinaria**, v. 27, n. 4, p. 255-262, 2011.
- BERNARDES, T. F.; DO RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.97, n. 3, p. 1852-1861, 2014.
- BORREANI, G.; TABACCO, E.; SCHMIDT, R. J.; HOLMES, B. J.; MUCK, R. E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n.5, p. 3952-3979, 2018.

- BRODERICK, G. A.; KANG, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid in vitro media. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 64-75, 1980.
- CASALI, A. O.; DETTMANN, E.; VALADARES, F. S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUE, L. T.; FREITAS, S. C.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 335-342, 2008.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; **Stage of soybean development**. Special report 80. Co-operative Extension Service, Iowa State University, Ames, Iowa, EUA, 1977.
- FERRARETTO, L. F.; GOESER, J. P.; SHAVER, R. D. Case study: Fermentation of frozen whole-plant corn silage and high-moisture corn after thawing. **The professional Animal Scientist**, v. 33, n. 4, p. 504-508, 2017.
- GANDRA, J. R.; TAKIYA, C. S.; DEL VALLE, T. A.; OLIVEIRA, E. R.; DE GOES, R. H. T. B.; GANDRA, E. R. S.; BATISTA, J. D. O.; ARAKI, H. M. C. Soybean whole-plant ensiled with chitosan and lactic acid bacteria: Microorganism counts, fermentative profile, and total losses. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 1-10, 2018.
- GHIZZI, L. G.; DEL VALLE, T. A.; ZILIO, E. M. C.; SAKAMOTO, L. Y.; MARQUES, J. A.; DIAS, M. S. S.; NUNES, A. T.; GHELLER, L. S.; SILVA, T. B. P.; GRIGOLETTO, N. T. S.; TAKIYA, C. S.; SILVA, G. G.; RENNÓ, F. P. Partial replacement of corn silage with soybean silage on nutrient digestibility, ruminal fermentation, and milk fatty acid profile on dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 266, p.114526, 2020.
- HALL, M. B. **Calculation of Non-structural Carbohydrate Content of Feeds That Contain Non-Protein Nitrogen**, University of Florida, Gainesville p. A-25, Bulletin 339, 2000.
- KANEDA, T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 288-302, 1991.
- KENWARD, M. G.; ROGER, J. H. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, v. 53, n. 3, p. 983-997, 1997.
- KUNG JR, L. Aerobic stability of silage. In: CALIFORNIA ALFALFA AND FORAGE SYMPOSIUM AND CORN/CEREAL SILAGE CONFERENCE, 2010, Visalia, CA, **Proceedings...** 2010. p.14.
- LIMA, R.; LOURENÇO, M.; DÍAZ, R. F.; CASTRO, A.; FIEVEZ, V. Effect of combined ensiling of sorghum and soybean with or without molasses and lactobacilli on silage quality and in vitro rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 155, n.2, p. 122-131, 2010.
- MCALLISTER, T. A.; HRISTOV, A. N.; The fundamentals of making good quality silage. **Advances in Dairy Technology**, v. 12, p. 381-399, 2000.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, N.; HERSON, S. **The biochemistry of silage**. 2 ed. Marlow, Chalcombe, USA, 1991.

MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; MCALLISTER, T. A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.; SANTOS, M. C.; KUNG JR, L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**, v.101, n. 5, p. 3980-4000, 2018.

MUCK, R. E.; KUNG, JR, L. Effects of silage additives on ensiling. IN: **SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK NORTH AMERICAN CONFERENCE**, 1997, Hershey, PA, EUA, 1997. **Proceedings...** p.187-199.

NI, K.; WANG, F.; ZHU, B.; YANG, J.; ZHOU, G.; PAN, Y.; TAO, Y.; ZHONG, J. Effects of lactic acid bacteria and molasses additives on the microbial community and fermentation quality of soybean silage. **Bioresource Technology** v. 238, p. 706-715, 2017.

NISHINO, N.; LI, Y.; WANG, C.; PARVIN, S. Effects of wilting and molasses addition on fermentation and bacterial community in guinea grass silage. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, p. 175-181, 2012.

NKOSI, B. D.; MEESKE, R.; LANGA, T.; MOTIANG, M. D.; MOODIBA, S.; MKINZE, N. R.; GROENEWALD, I. B. Effects of ensiling forage soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) with or without bacterial inoculants on the fermentation characteristics, aerobic stability and nutrient digestion of silage by Damara rams. **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 90-96, 2016.

OBEID, J. A.; GOMIDE, J. A.; CRUZ, M. E.; ZAGO, C. P.; ANDRADE, M. A. S. Quality and nutritive value of consortiated Corn (*Zea Mays*, L.) and legumes for silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 21, n. 1, p. 33-38, 1992.

OLIVEIRA, A. S.; WEINBERG, Z. G.; OGUNADE, I. M.; CERVANTES, A. A. P.; ARRIOLA, K. G.; JIANG, Y.; KIM, D.; LI, X.; GONCALVES, M. C. M.; VYAS, D.; ADESOGAN, A. T. Meta-analysis of effects of inoculation with homofermentative and facultative heterofermentative lactic acid bacteria on silage fermentation, aerobic stability, and the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4587-4603, 2017.

PARRA, C. S.; BOLSON, D. C.; JACOVACI, F. A.; NUSSIO, L. G.; JOBIM, C. C.; DANIEL, J. L. P.; Influence of soybean-crop proportion on the conservation of maize-soybean bi-crop silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 257, p. 114295, 2019.

PLAYNE, M. J.; MCDONALD, P. The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.17, n. 6, p. 264-268,1966.

PRYCE, J. D. A. Modification of the Barker-Summerson Method for the Determination of Latic Acid. **Analyst**, v. 94, n. 125, p.1151-1152, 1969.

ROSA, L. O.; PEREIRA, O. G.; RIBEIRO, K. G.; VALADARES, F. S. C.; CECON, P. R. Fermentation profile and microbial population in soybean silage with inoculant and powdered molasses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1586-1594, 2018.

SCHERER, R.; GERLACH, K.; SUDEKUM, K. H. Biogenic amines and gamma-amino butyric acid in silages: Formation, occurrence, and influence on dry matter intake and ruminant production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 210, p. 1-16, 2015.

THOMPSON, D. N.; BARNES, J. M.; HOUGHTON, T. P. Effect of additions on ensiling and microbial community of senesced wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 121, p. 21-46, 2005.

TOBÍA, C.; VILLALOBOS, E.; ROJAS, A.; SOTO, H.; MOORE, K. J. Nutritional value of soybean (*Glycine max* L. Merr.) silage fermented with molasses and inoculated with *Lactobacillus brevis*. **Livestock Research for Rural Development** v. 20, n. 7, p. 1-11, 2008.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THIEX, N. **Forage analyses procedures**. Omaha, USA, 1993, p. 154.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A.; Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 53-68, 1996.

YANG, L.; YUAN, X.; LI, J.; DONG, Z.; SHAO, T. Dynamics of microbial community and fermentation quality during ensiling of sterile and nonsterile alfalfa with or without *Lactobacillus plantarum* inoculant. **Bioresource Technology**, v. 275, p. 280-287, 2018.

## 4 SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE SILAGEM DE MILHO POR SILAGEM DE PLANTA INTEIRA DE SOJA NA DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES, FERMENTAÇÃO RUMINAL E PERFIL DA GORDURA DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS

### 4.1 RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da inclusão de níveis crescentes de silagem de planta inteira de soja (SS) em substituição parcial a silagem de milho (SM) na dieta de vacas leiteiras sobre o consumo alimentar, digestibilidade aparente no trato total, fermentação ruminal, produção de leite, composição e perfil da gordura do leite, metabólitos sanguíneos e comportamento alimentar. Vinte e quatro vacas da raça Holandesa foram utilizadas em delineamento quadrado Latino 4×4 (21 dias cada período experimental) com amostras sendo colhidas durante os últimos sete. Os tratamentos consistiram em dieta controle (CON), com 480 g/kg de matéria seca (MS) de SM e inclusão da SS (ensilada no estágio fenológico R5,5) em substituição a SM nos níveis de 167, 333 e 500 g/kg de MS. A adição de SS linearmente reduziu o consumo e digestibilidade no trato total da MS bem como o consumo de partículas < 4 mm. Vacas alimentadas com SS linearmente aumentaram o pH ruminal e os teores de butirato, nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia ramificada do rúmen. A substituição da SM por SS reduziu linearmente a produção de leite e sólidos bem como linearmente aumentou a concentração de ácidos graxos insaturados (C18:1 e C18:2) e de cadeia longa (> C16). A síntese de proteína microbiana foi linearmente reduzida enquanto a ureia sérica foi linearmente aumentada pela inclusão de SS. Um efeito quadrático positivo foi observado para tempo de ruminação e mastigação (min/dia) para animais alimentados com SS. A substituição de SM por SS ensilada no estágio fenológico R5,5 reduziu o consumo alimentar e a produção pelas vacas leiteiras sem afetar o teor de gordura no leite. Entretanto, a inclusão de SS na dieta de vacas leiteiras pode ser utilizado para modular a fermentação ruminal e aumentar o teor de ácidos graxos de cadeia longa e insaturados na gordura do leite.

**Palavras-chave:** Ácidos graxos. *Glycine max*. Perfil da gordura do leite. Produção de leite.



## 4.2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of replacing corn silage (CS) with whole-plant soybean silage (SS) in dairy cows diet on nutrient intake and apparent total tract digestibility, rumen fermentation, milk yield, composition and fatty acid profile of milk, serum metabolites, and feeding behavior. Twenty-four Holstein cows were enrolled in a replicated 4×4 Latin square experiment (21 d-periods), with samples and data collected during the last 7 d of each period. Treatments consisted of a control diet (CON) with 480 g/kg dry matter (DM) CS, and SS (ensiled at R5,5 phenological stage) replacing CS at 167, 333, and 500 g/kg DM. Soybean silage linearly decreased DM intake and digestibility, and intake of feed particles shorter than 4 mm. Cows fed SS had a linear increase in ruminal pH and ruminal concentrations of butyrate, branched-chain fatty acids, and NH<sub>3</sub>-N. Soybean silage linearly decreased milk and solids yield. Dietary inclusion of SS at the expense of CS linearly increased milk fat concentration of unsaturated (C18:1 and C18:2) and long-chain fatty acids (>C16). Microbial protein synthesis was linearly decreased, and blood urea nitrogen concentration was linearly increased by SS treatments. Soybean silage had a positive quadratic effect on periods of rumination and chewing (min/d). Replacing CS with SS ensiled at R5,5 phenological stage decreases feed intake and performance of cows, without affecting milk fat content. Dietary SS, however, can be used to modulate ruminal fermentation and increase long-chain fatty acids (>C16) and unsaturated fatty acids proportion on milk fat.

**Keywords:** Fatty acids. *Glycine max*. Milk fatty profile. Milk yield.

## 4.3 INTRODUÇÃO

Muitos são os benefícios da adoção da cultura da soja (*Glycine max*) na sustentabilidade dos sistemas agropecuários, como o aumento do sequestro de carbono, fixação de nitrogênio no solo, redução da emissão de gases do efeito estufa produzidos na eructação dos animais e redução da adubação nitrogenada (STAGNARI et al., 2017). Em países de clima tropical como o Brasil, o interesse na cultura da soja como fonte proteica oriunda de forragem tem aumentado. Embora pouco explorada na forma de silagem para alimentação animal, pesquisas voltadas a produção e uso da silagem de planta inteira de soja (SS) tem crescido (GANDRA et al., 2018; ROSA et al., 2018), muito em função da adaptação climática da cultura, alta produtividade de

grãos e principalmente pelo elevado teor de proteína bruta (PB) em sua composição (GOBETTI et al., 2011).

Apesar dos desafios da planta de soja (PS) para ser ensilada, estudos recentes tem mostrado que o perfil de fermentação e a composição bromatológica da SS são aceitáveis para alimentação de vacas leiteiras (VARGAS-BELLO-PÉREZ et al., 2008) principalmente quando aditivos são utilizados durante o processo de ensilagem (GANDRA et al., 2018; ROSA et al., 2018). Além disso, a ensilagem da planta de milho juntamente com a de soja resulta num material com maior teor de fibra em detergente neutro (FDN) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (MS) do que comparado com a silagem de milho (SM) isoladamente (BAGHDADI et al., 2016).

A ensilagem de leguminosas sozinhas ou associadas com gramíneas tem melhorado o consumo alimentar (DEWHURST et al., 2003; JOHANSEN et al., 2018), produção de leite e sólidos (BRODERICK et al., 2002), e teor de gordura no leite (VARGAS-BELLO-PÉREZ et al., 2008). Embora a SS possa substituir a silagem de alfafa sem afetar a eficiência alimentar e produção de leite corrigido para energia de vacas produzindo 35 kg/dia (VARGAS-BELLO-PÉREZ et al., 2008), não há informações na literatura a respeito do nível de inclusão da SS na dieta de vacas leiteiras. Ainda, o uso de grãos de soja inteiro na dieta de vacas leiteiras, aumentou a participação de ácidos graxos insaturados (AGI) na gordura no leite (BARLETTA et al., 2016) e esse mesmo efeito poderia ser esperado quando utilizado SS.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de SS em substituição a SM na dieta de vacas leiteiras sobre o consumo e digestibilidade aparente no trato total da MS e nutrientes, índice de seleção de partículas, comportamento alimentar, fermentação ruminal, produção e perfil da gordura do leite. A hipótese do estudo foi de que a inclusão da SS melhore a produção das vacas alterando o perfil da gordura do leite de maneira dose dependente.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais na Experimentação da FMVZ-USP sob protocolo n. 4399230118.

#### 4.4.1 Produção e utilização da silagem de soja

O material utilizado para produção da SS foi oriundo do mesmo campo experimental disposto no item 2.4.1 Estabelecimento da cultura do capítulo 2. A silagem foi confeccionada quando mais de 50% das plantas se encontravam em estágio fenológico R5,5 (FEHR; CAVINESS, 1977). Para tal foi utilizado ensiladeira Nogueira<sup>®</sup> New Pecus Duo, acoplada com plataforma recolhadora Nogueira<sup>®</sup> PRN 2.000 D em fevereiro de 2017. O material picado foi inoculado com cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* na dose de  $10^5$  UFC/g de matéria natural (MN; Silobac<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) e compactado em silo tipo parede com dimensões de 4,5 m de largura, 1 m de altura e 30 m de comprimento, revestido nas faces laterais e superior, com lona de polietileno de camada dupla e espessura de 200  $\mu$ m. O silo foi dimensionado para desabastecimento diário, com retirada total do painel do silo e fatia de corte de 0,3 m. A SS permaneceu estocada por 7 meses até o início do experimento com os animais.

#### 4.4.2 Animais, delineamento experimental e arranjo de tratamentos

Vinte e quatro vacas (sendo 8 canuladas no rúmen) multíparas da raça Holandesa com  $136 \pm 86,3$  dias em leite (DEL),  $660 \pm 90,4$  kg de peso vivo (PV) e  $32,7 \pm 5,20$  kg/dia de produção de leite (PL) no início do experimento (média  $\pm$  DP) foram utilizadas. Os animais foram alojados em estábulo tipo “free-stall”, em baias individuais de 17,5 m<sup>2</sup>, com piso concretado, camas de areia, ventilação e livre acesso ao cocho de comida e água.

Os animais foram blocados em seis grupos de acordo com DEL, PL, paridade e presença de canula ruminal, alocadas em delineamento quadrado Latino 4 $\times$ 4 contemporâneos e balanceado para efeito *carry over* com 21 dias de duração cada período sendo 14 para adaptação e 7 para coleta amostral. Dentro de cada grupo, os animais receberam aleatoriamente uma das 4 sequências dos tratamentos obtidos em arranjo em níveis: controle com SM como única fonte de volumoso na ordem de 480 g/kg de MS da dieta e substituição da SM por SS na proporção de 167, 333 ou 500 g/kg da MS do volumoso (0, 16, 33 e 50 % respectivamente). As dietas experimentais foram formuladas de acordo com software NRC (2001) com níveis similares de proteína degradável no rúmen (PDR), proteína não degradável no rúmen (PNDR) e FDN (Tabela 4.1). Os níveis de substituição foram definidos equidistantemente sendo que o mais alto foi estabelecido como 500 g/kg da MS do volumoso para evitar inclusão excessiva de gordura na dieta criando um viés nos efeitos, interferindo nos resultados. As dietas foram oferecidas aos

animais duas vezes ao dia (08:00 e 13:00 horas) na forma de dieta total misturada (TMR) mantendo nível de sobras entre 5 e 10% com base na MN.

Tabela 4.1 - Ingredientes, composição bromatológica e distribuição média de partículas das dietas experimentais

Item	Dietas experimentais <sup>1</sup>				Silagem de soja <sup>2</sup>	Silagem de milho
	0	16	33	50		
<b>Ingredientes, g/kg MS</b>						
Silagem de milho	480	400	320	240		
Silagem de soja		80,0	160	240		
Milho moído	228	240	253	265		
Farelo de soja, 480 g/kg PB	160	141	123	105		
Grão de soja	45,0	45,0	45,0	45,0		
Polpa cítrica	40,0	40,0	40,0	40,0		
Soypass <sup>3</sup>	18,0	24,6	30,0	36,0		
Núcleo mineral <sup>4</sup>	13,0	13,0	13,0	13,0		
Bicarbonato de sódio	7,00	7,00	7,00	7,00		
Calcário	7,00	7,00	7,00	7,00		
Sal	2,00	2,00	2,00	2,00		
<b>Composição bromatológica, g/kg MS</b>						
Matéria seca, g/kg MN	391	390	388	386	236	244
Carboidratos não fibrosos <sup>5</sup>	373	366	361	355	145	299
Fibra em detergente neutro	350	350	349	349	557	551
FDN poten. digestível <sup>6</sup>	256	245	232	220	235	372
FDN indigestível	94,0	105	117	129	322	179
FDN advinda de forragem	265	264	263	262		
Amido	238	236	234	232	25,7	177
Proteína bruta	176	175	174	173	134	83,9
PIDN <sup>7</sup>	25,8	26,0	26,1	26,2	3,57	1,72
Cinzas	67,4	71,1	74,6	78,3	94,2	4,33
Extrato etéreo	33,3	37,4	41,4	45,5	70,3	22,7
ELI <sub>3x</sub> <sup>8</sup> , Mcal/kg MS	1,58	1,59	1,59	1,59	1,39	1,44
<b>Distribuição de partículas, g/kg MN</b>						
> 19 mm	53,8	65,4	80,4	92,2	234	65,8
8 - 19 mm	350	361	367	374	496	550
4 - 8 mm	229	215	211	201	189	262
< 4 mm	377	364	348	337	81,0	122

<sup>1</sup>Dieta controle (0) com silagem de milho na proporção de 480 g/kg da MS da dieta e silagem de planta inteira de soja substituindo a silagem de milho na ordem de 167, 333 e 500 g/kg da MS do volumoso (16, 33 e 50 respectivamente);

<sup>2</sup>Silagem de planta inteira de soja colhida em estágio fenológico R5,5 (Fehr e Caviness, 1977);

<sup>3</sup>Farelo de soja Soypass® (Cargill, Uberlândia, Brasil);

<sup>4</sup>Cada kg contém: 235g de Ca; 60g de P; 20g de S; 20g de Mg; 35g de K; 70g de Na; 15mg de Co; 700mg de Cu; 10mg de Cr; 600mg de Fe; 40Mg de I; 1600mg de Mn; 20mg de Se; 2.500mg de Zn; 200.000UI de Vit A; 50.000UI de Vit D3 e 1.500UI de Vit. E;

<sup>5</sup>Carboidrato não fibroso;

<sup>6</sup>Estimado por diferença.

<sup>7</sup>Proteína insolúvel em detergente neutro.

<sup>8</sup>Energia líquida de lactação calculada de acordo com NRC (2001).

#### 4.4.3 Coleta amostral

Amostras de SM, SS e sobras foram diariamente coletadas durante o período de coleta e misturadas a fim de obter uma amostra composta por período para SM e SS bem como por vaca/período para sobras. Amostras de ingredientes do concentrado (milho moído, farelo de soja, *soypass*<sup>®</sup>, polpa cítrica, grão de soja, núcleo mineral, bicarbonato de sódio, calcário e sal) foram amostrados semanalmente a partir de cada batida produzida na fábrica de rações da FMVZ-USP, obtendo uma amostra composta por período. Amostras de SM, SS, sobras e ingredientes do concentrado foram pré-secos em estufa com ventilação forçada à 55 °C por 72 horas e moídas em moinho de facas tipo Willey (MA340, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 2 e 1 mm. O consumo alimentar médio de cada período de coleta foi considerado para análises estatísticas. Amostras de sobras de cada animal bem como TMR foram amostradas nos dias 16 e 17 de cada período experimental para avaliação de índice da distribuição de partículas (Penn State Particle Separator; HEINRICHS; KONONOFF, 2013) e cálculo do índice de seleção (SILVEIRA et al., 2007).

Amostras de fezes e urina (150 g e 100 mL, respectivamente) foram coletadas de cada animal com intervalos de 9 horas iniciando no dia 18 as 06:00 horas e encerrando no dia 20 as 21:00 horas totalizando 9 amostras, as quais foram homogeneizadas (proporcionalmente na MN) obtendo uma amostra composta por vaca/período. As fezes foram coletadas diretamente do reto, secas e moídas como previamente descritos. Já as amostras de urina foram obtidas por meio de massagem subvulvar, imediatamente após, diluída (1:4 v/v) em solução de ácido sulfúrico 0.036 N (VERBIC et al., 1990) e congeladas até a determinação de creatinina, alantoína, e ácido úrico.

Digesta ruminal foi coletada no dia 21 de cada período experimental com intervalo de 2 horas (0 até 16 horas em relação a alimentação matinal) de 5 pontos ruminais distintos (dorso-cranial, ventral-cranial, ventral, caudo-ventral e caudo-dorsal) das vacas canuladas. Amostras da digesta ruminal foram comprimidas em pano dessorador para obtenção do líquido ruminal o qual foi imediatamente avaliado quanto ao pH (MB-10, Marte Científica<sup>®</sup>, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). Uma alíquota (50 mL) de líquido ruminal foi congelada para posterior análise de ácidos orgânicos (AO) e nitrogênio amoniacal (NH<sub>3</sub>-N).

Amostras de sangue foram obtidas 4 horas após a alimentação matinal no dia 17 de cada período experimental por punção de vasos sanguíneos coccígeos em tubo sem anticoagulante (BD Vacutainer<sup>®</sup>, Becton, Dickinson e Company, Franklin Lakes, Nova Jersey). Após a coagulação do sangue, o material foi centrifugado (2,000 × g por 15 min em temperatura

ambiente) e o soro congelado em *epperdorf* até análises de glicose, nitrogênio ureico sérico (NUS), aspartato-aminotransferase (AST) e gama-glutamyl transferase (GGT).

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia (06:00 e 16:00 horas). A produção de leite foi diariamente obtida de forma automática (Alpro<sup>®</sup>, DeLaval, Tumba, Sweden) e dados médios do período de coleta utilizados para análise estatística. Amostras de leite (350 mL) coletados nos dias 14, 15 e 16 do período experimental foram analisados a fresco para teores de gordura, proteína e lactose por método infravermelho (Lactoscan<sup>®</sup>, Entelbra, Londrina, Brasil). Alíquotas de leite (10 mL) coletadas no dia 15 do período experimental foram desproteinizadas com ácido tricloroacético (5 mL de ácido tricloroacético 25% em 10 mL de leite) e filtradas em papel-filtro de acordo com Broderick e Clayton (1997) para análise de nitrogênio ureico no leite (NUL) e alantoína. Uma amostra de leite integral (50 mL) foi congelada para análise do perfil de ácidos graxos. A produção de leite corrigido para energia (LCE) foi calculada de acordo com Tyrrell e Reid (1965).

Para as variáveis de comportamento alimentar, as vacas foram visualmente monitoradas quanto ao tempo despendido bebendo água, consumindo alimentos, deitada, em pé, e em ordenha. As atividades foram obtidas a cada 5 min. por 72 horas das 06:00 horas do dia 14 até 06:00 horas do dia 17 de cada período experimental. Já o tempo de ruminação foi obtido eletronicamente por meio de colares acoplado às vacas com monitoramento remoto (HealthyCow 24<sup>®</sup> Solution, SCR Allflex, Netanya, Israel). O tempo em ócio foi considerado como: 24 horas menos a soma dos tempos bebendo água, comendo e em ordenha, enquanto o tempo mastigando foi considerado como a soma do tempo gasto comendo mais o tempo ruminando.

#### **4.4.4 Análises laboratoriais**

Para os cálculos de consumo e digestibilidade aparente no trato total amostras compostas de alimentos, sobras e fezes moídas a 1 mm foram analisadas para os teores de MS (método 930.15; AOAC, 2000), PB ( $N \times 6,25$ ; método Kjeldahl 984.13; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC, 2000), matéria mineral (MM; método 942.05; AOAC, 2000), e FDN (VAN SOEST et al., 1991) utilizando alfa amilase (UNDERSANDER et al., 1993) sem adição de sulfito (Analisador de fibra TE-149, Laboratório e Equipamentos Tecnal, Piracicaba, Brasil). O teor de carboidratos não fibrosos (CNF) foi calculado de acordo com Hall (2000):  $CNF = 1.000 - [(FDN - NIDN \times 6,25) + PB + EE + MM]$ , onde NIDN é a fração nitrogenada quantificada no resíduo da análise de FDN. Amostras de alimentos foram também analisadas

quanto aos teores de FDA pelo método sequencial (VAN SOEST et al. 1991) e amido pelo método de degradação enzimática (Termamyl Amyloglucosidase AMG 300L, Novozymes, Basal, Suécia) com a leitura da absorvância realizada por meio de espectrofotômetro (SBA 200, CELM<sup>®</sup>, São Caetano do Sul, Brasil) como descrito por Hendrix (1993).

A FDN indigestível (FDNi) foi utilizado como marcador interno para estimar produção fecal. Amostras compostas de fezes, alimentos e sobras moídas a 2 mm foram acondicionadas em sacos de TNT (CASALI et al., 2008) com porosidade de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  e dimensões de 5 x 5 cm (0,5 g; seguindo a relação de 20 mg de MS/cm<sup>2</sup> de superfície (NOCEK, 1988) e incubadas por 288 h (HUHTANEN et al., 1994) no rúmen de duas vacas Holandesas canuladas. Após o período de incubação os sacos foram manualmente enxaguados em água fria corrente e o resíduo submetido a análise de FDN como previamente descrito.

Amostras de líquido ruminal foram centrifugadas (500  $\times$  g por 15 min, em temperatura ambiente). Alíquota (0,9 mL) do sobrenadante foi homogeneizada com ácido sulfúrico (450  $\mu\text{L}$  a 1N) e analisado quanto ao teor de NH<sub>3</sub>-N pelo método colorimétrico fenol-hipoclorito (BRODERICK; KANG, 1980). Uma nova alíquota (1,6 mL) foi homogeneizada com ácido orto-fosfórico (0,4 mL a 20%) para análise de AO. A leitura dos picos de AO foram determinadas por cromatografia gasosa (Shimadzu<sup>®</sup> GC-2014 Plus, Kyoto, Japan) em cromatógrafo equipado com injetor automático (AOC-20i a 300°C) coluna de vidro capilar (Stabilwax-DA<sup>™</sup>; 30 m de comprimento e 0,25 mm d.i Restek<sup>®</sup>, Bellefonte, EUA) e detector de ionização de chama usando hélio como gás de arraste, velocidade linear de 42 cm<sup>3</sup>/s e uma corrida cromatográfica de 11,5 min. Com temperatura inicial da coluna de 40 °C a rampa de aquecimento seguiu aumento de 40 para 120 °C com taxa de 40 °C/min, seguida de 120 para 180 °C, a 10 °C/min, e de 180 para 240 °C, a 120 °C/min, mantendo a temperatura de 240 °C por 3 min, até o final da corrida. A análise dos picos foi realizada por meio do software GCsolution (v.2.42.00; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão).

Para análise do perfil de ácidos graxos na gordura do leite, a gordura foi extraída e metilada de acordo com Feng et al. (2004) e Kramer et al. (1997) respectivamente. Os picos de metil-ésteres de ácidos graxo foram quantificados por cromatógrafo a gás (GC Shimadzu 2010, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com injetor automático (SP-2560) e coluna capilar (100 m  $\times$  0,25 mm d.i. e 0.02  $\mu\text{m}$  de espessura; Supelco, Sigma-aldrich, Bellefonte, EUA) utilizando hidrogênio como gás de arraste, velocidade linear de 40 cm<sup>3</sup>/s e corrida cromatográfica de 90 min. A temperatura da coluna foi mantida em 70 °C por 4 min., aumentando 13 °C/min. até alcançar 175 °C, mantendo-a por 27 min. e por fim elevando 4 °C/min até alcançar 215 °C cuja temperatura foi mantida por 31 min. O ácido esteárico (C18:0)

foi utilizado como padrão externo e o ácido n-nonadecílico (C19:0) como padrão interno para corrigir as perdas durante o processo de metilação. Durante o processo de identificação foram utilizados quatro padrões: C4-C24 (TM 37, Supelco<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich), ácido vacênico (C18:1 *trans*-11; V038-1G, Supelco<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich), ácido linoleico conjugado (C18:2 *trans*-10, *cis*-12; UC-61M 100mg, Nu-Chek-Prep<sup>®</sup>, Inc. Elysian, Minnesota, EUA) e ácido rumênico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11; UC-60M 100 mg, Nu-Chek-Prep<sup>®</sup>, Inc. Elysian, Minnesota, EUA).

Kits colorimétricos de bioquímica (Bioclin<sup>®</sup>, Belo Horizonte, Brasil) foram utilizados para mensurar a concentração de creatinina, alantoína e ácido úrico na urina, bem como, alantoína e NUL no leite, glicose, NUS, AST e GGT no sangue. As leituras de absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro semiautomático (SBA-200, CELM<sup>®</sup>). O teor de nitrogênio urinário foi quantificado pelo teor de nitrogênio da urina por meio do método Kjeldahl (984.13; AOAC, 2000).

#### 4.4.5 Cálculos e análise estatística

A intensidade de seleção de partículas foi expressa pelo índice de seleção (IS) correspondente a cada peneira P1 a P4 (P1 = retenção de partículas < 19 mm; P2 = retenção de partículas entre 19 e 8 mm; P3 = retenção de partículas entre 8 e 4 mm e P4 = com fundo fechado, a qual retém partículas com diâmetro < 4 mm) sendo que IS = 1, indica ausência de seleção, IS < 1, indica seleção contrária e IS > 1, indica preferência. O IS foi calculado usando a seguinte equação proposta por Silveira et al. (2007):

$$IS = \frac{(OF \times TP_{TMR}) - (SO \times TP_{SO})}{C \times TP_{TMR}},$$

onde, OF é a quantidade da dieta oferecida (g), TP<sub>TMR</sub> é a proporção da TMR retida na peneira P<sub>i</sub> (%), SO é a quantidade de sobras (g), TP<sub>SO</sub> é a proporção da sobra retida na peneira P<sub>i</sub> (%), e C é o consumo de MN.

O consumo de MS (CMS; kg/dia) e nutrientes (CN; kg/dia) foram calculados por meio da diferença ofertada ao animais e sobras (kg/d). A digestibilidade aparente no trato total da MS e nutrientes foram calculadas de acordo com as seguintes equações:

$$\text{Digestibilidade da MS (g/kg)} = \frac{[CMS - ETF] \times 1000}{CMS},$$

$$\text{Digestibilidade dos Nutrientes (g/kg)} = \left[ \frac{CN - EN}{CN} \right] \times 100,$$



onde, ETF é a excreção total fecal estimada com base no consumo de FDNi e de sua concentração nas fezes, de acordo com a equação:

$$ETF \text{ (kg/d)} = \frac{FDNi_{\text{consumido}} \text{ (kg/d)}}{FDNi_{\text{fezes}} \text{ (kg)}}$$

e EN é a excreção de nutrientes (g/kg):  $ETF \text{ (kg/d)} \times NF \text{ (g/kg)}$  sendo NF a concentração de nutrientes nas fezes

A produção de leite foi corrigida para energia considerando a PL, produção de gordura (PG) e produção de proteína (PP) de acordo com Tyrrell e Reid (1965):

$$LCE \text{ (kg/d)} = 0,327 \times PL + 12,86 \times PG + 7,65 \times PP \text{ (kg/d)}$$

A excreção de urina diária foi estimada a partir da concentração urinária de creatinina, considerando o fator de excreção 0,212 mmol de creatinina por kg de peso vivo (PV) por dia (CHIZZOTTI et al., 2008).

A estimativa da síntese de proteína microbiana (SPM) foi mensurada de acordo com metodologia descrita por Chen e Gomes (1992) a partir da quantificação dos derivados de purinas (DP) excretados na urina (alantoína e ácido úrico) e no leite (alantoína), considerando 0,385 mmol/kg PV<sup>0,75</sup> como contribuição endógena para excreção de purinas e 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas (VERBIC et al., 1990) com a equação a seguir:

$$SPM \text{ (g/d)} = \left( \frac{APur \times 70}{0,116 \times 0,83 \times 1000} \right) \times 0,00625,$$

onde APur representa a quantidade de purinas absorvidas (mmol/dia), 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol); 0,83, a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116, a relação N-purina: N total nas bactérias (CHEN; GOMES, 1992).

Os dados foram analisados pelo PROC MIXED do SAS 9.4 (Statistical Analyses for Windows - Institute Inc., Cary, EUA) de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + P_j + Q_k + a_{l:k} + e_{ijkl},$$

com  $a_{l:k} \approx N(0; \sigma_a^2)$  e  $e_{ijkl} \approx N(0; \sigma_e^2)$ ; onde:  $Y_{ijkl}$  = é a observação do animal l, recebendo o tratamento i, no período j e quadrado k;  $\mu$  = média geral;  $S_i$  = efeito fixo da inclusão de SS ( $i =$

1 à 4);  $P_j$  = efeito fixo de período ( $j = 1$  à 4);  $Q_k$  = efeito fixo do quadrado ( $k = 1$  à 6);  $a_{l:k}$  = efeito aleatório de animal dentro de quadrado ( $l = 1$  à 24);  $e_{ijkl}$  = erro aleatório associado a unidade experimental;  $N$  = distribuição normal;  $\sigma_a^2$  = variância associada a vaca;  $\sigma_e^2$  = variância residual.

Variáveis de fermentação ruminal foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando o PROC MIXED do SAS 9.4, de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijklm} = \mu + S_i + P_j + Q_k + a_{l:k} + \omega_{ijkl} + T_m + T \times S_{mi} + e_{ijklm}$$

com  $a_{l:k} \approx N(0; \sigma_a^2)$ ,  $\omega_{ijkl} \approx N(0; \sigma_\omega^2)$ , e  $e_{ijklm} \approx MVN(0; R)$ ; onde  $Y_{ijklm}$  é a observação do animal  $l$ , recebendo o tratamento  $i$ , no período  $j$ , bloco  $k$  e tempo  $m$ ;  $\omega_{ijkl}$  = erro residual associado a vaca dentro do período;  $T_m$  = efeito fixo de tempo de coleta ( $m = 1$  à 9);  $T \times S_{mi}$  = efeito fixo de interação entre o nível de inclusão de SS e tempo;  $\sigma_\omega^2$  = variância associada a unidade experimental (vaca dentro de período);  $MVN$  = distribuição normal multivariada;  $R$  = matriz de variância e covariância dos resíduos para medidas repetidas no tempo. Efeitos  $\mu$ ,  $S_i$ ,  $P_j$ ,  $Q_k$  e  $a_{l:k}$  foram previamente descritos. A metodologia de Kenward e Rogers (1997) foi utilizada para a correção dos graus de liberdade. As matrizes de variância e covariância foram avaliadas [CS, CSH, AR(1), ARH(1), TOEP, TOEPH, UN, FA(1) e ANTE(1)] e escolhidas pelo método Baesiano. O efeito da inclusão dos níveis de SS foi decomposto por contrastes ortogonais para avaliação de efeitos linear, quadrático e cúbico. O nível de significância foi estabelecido como  $P \leq 0,05$ .

#### 4.5 RESULTADOS

A substituição de SM por SS reduziu linearmente ( $P \leq 0,023$ ) o consumo de MS, MO, CNF e PB bem como aumentou linearmente ( $P < 0,001$ ) o consumo de EE (Tabela 4.2). A SS também diminuiu linearmente ( $P < 0,001$ ) a digestibilidade aparente no trato total da MS, MO, FDN e PB. Vacas alimentadas com maiores níveis de SS na dieta aumentaram ( $P < 0,001$ ) a preferência de consumo de partículas entre 8 -19 mm, e rejeitaram ( $P = 0,005$ ) aquelas com tamanho  $< 4$  mm.

Tabela 4.2 - Consumo de matéria seca e nutrientes, digestibilidade aparente no trato total e índice de seleção de partículas de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P-valor <sup>3</sup>		
	0	16	33	50		L	Q	C
Consumo, kg/dia								
Matéria seca	23,7	23,6	23,2	23,1	0,283	0,023	0,85	0,36
Matéria orgânica	21,9	22,0	21,5	21,3	0,262	0,011	0,59	0,32
Carboidrato não fibroso	9,44	9,39	9,03	9,79	0,108	<0,001	0,31	0,32
Fibra em detergente neutro	7,84	7,92	7,82	7,78	0,096	0,44	0,52	0,49
Proteína bruta	4,37	4,34	4,18	4,09	0,052	<0,001	0,49	0,26
Extrato etéreo	0,816	0,919	0,983	1,05	0,010	<0,001	0,070	0,30
Digestibilidade aparente no trato total, g/kg								
Matéria seca	728	711	682	667	3,25	<0,001	0,88	0,34
Matéria orgânica	743	724	698	685	3,21	<0,001	0,54	0,69
Fibra em detergente neutro	572	535	508	473	5,45	<0,001	0,91	0,39
Proteína bruta	757	732	698	676	3,27	<0,001	0,81	0,40
Extrato etéreo	879	880	873	880	3,58	0,82	0,62	0,46
Índice de seleção <sup>4</sup>								
> 19 mm	0,951	0,962	0,940	0,959	0,0048	0,98	0,65	0,09
8 - 19 mm	0,975	0,983	0,987	0,989	0,0017	<0,001	0,29	0,91
4 - 8 mm	0,997	0,990	0,999	0,991	0,0013	0,51	0,79	0,009
< 4 mm	1,041	1,033	1,028	1,029	0,0018	0,005	0,17	0,77

<sup>1</sup>Dieta controle (0) com silagem de milho na proporção de 480 g/kg da MS da dieta e silagem de planta inteira de soja substituindo a silagem de milho na ordem de 167, 333 e 500 g/kg da MS do volumoso (16, 33 e 50, respectivamente); <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Probabilidade para efeito linear (L), quadrático (Q) e cúbico (C); <sup>4</sup>Se 1= ausência de seleção; se <1 indica seleção contrária; se >1 indica preferência de seleção.

Em relação ao perfil de fermentação ruminal, a inclusão de SS aumentou linearmente (P ≤ 0,009) pH, a concentração de NH<sub>3</sub>-N e relação ácido acético:ácido propiônico (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Perfil de ácidos graxos, pH e concentração de NH<sub>3</sub>-N ruminais de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	Tempo	Trat. x Tempo	P-valor <sup>3</sup>		
	0	16	33	50				L	Q	C
pH	6,26	6,31	6,33	6,39	0,020	<0,001	0,919	0,001	0,869	0,652
NH <sub>3</sub> -N <sup>4</sup> , mg/L	1,83	2,03	2,24	2,38	0,055	<0,001	0,742	<0,001	0,802	0,801
A:P <sup>5</sup>	2,73	2,79	2,91	3,06	0,043	<0,001	0,370	0,009	0,595	0,948
Ácidos graxos, mM										
Acetato	70,4	70,7	68,3	68,6	0,590	<0,001	0,670	0,153	0,986	0,292
Propionato	26,3	25,8	23,8	22,9	0,374	<0,001	0,505	<0,001	0,678	0,300
Butirato	16,5	17,3	16,7	18,3	0,331	<0,001	0,687	0,012	0,325	0,070
AGCR <sup>6</sup>	4,87	5,33	5,58	6,24	0,075	<0,001	0,123	<0,001	0,419	0,273
Total AG <sup>7</sup>	118	119	115	116	0,990	<0,001	0,724	0,246	0,935	0,205

<sup>1</sup>Dieta controle (0) com silagem de milho na proporção de 480 g/kg da MS da dieta e silagem de planta inteira de soja substituindo a silagem de milho na ordem de 167, 333 e 500 g/kg da MS do volumoso (16, 33 e 50, respectivamente); <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Probabilidade para efeito de Tempo, Tratamento vs tempo (Trat. x Tempo), linear (L), quadrático (Q) e cúbico (C); <sup>4</sup>Nitrogênio amoniacal; <sup>5</sup>Relação acetato e propionato; <sup>6</sup>Ácidos graxos de cadeia ramificada; <sup>7</sup>Total de ácidos graxos.

Vacas alimentadas com SS apresentaram aumento linear ( $P \leq 0,012$ ) na concentração ruminal de butirato e ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), ao passo que diminuíram de forma linear a concentração de ácido propiônico. Já a concentração de acetato e de ácidos graxos totais não foram afetadas ( $P \geq 0,153$ ) pelos tratamentos.

A inclusão da SS na dieta reduziu linearmente ( $P \leq 0,010$ ) na produção de leite, leite corrigido para energia, produção de gordura, proteína e lactose bem como os teores de proteína e lactose do leite sem afetar ( $P \geq 0,073$ ) os teores de NUL, gordura e eficiência leiteira (leite:CMS; Tabela 4.4). Já SPM foi linearmente reduzida ( $P = 0,007$ ) com a substituição da SM por SS.

Tabela 4.4 - Produção e composição do leite, nitrogênio ureico no leite, eficiência leiteira e síntese de proteína microbiana de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.

Item	Tratamentos <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P-valor <sup>3</sup>		
	0	16	33	50		L	Q	C
Produção, kg/dia								
Leite	33,0	32,2	31,2	31,5	0,33	<0,001	0,105	0,350
LCE <sup>4</sup>	33,3	32,2	31,4	31,4	0,21	0,001	0,150	0,897
Gordura	1,11	1,05	1,04	1,04	0,016	0,010	0,240	0,063
Proteína	1,08	1,05	1,02	1,02	0,010	<0,001	0,146	0,621
Lactose	1,62	1,58	1,53	1,53	0,015	<0,001	0,156	0,439
Composição do leite, g/100g								
Gordura	3,33	3,32	3,28	3,27	0,045	0,361	0,902	0,703
Proteína	3,29	3,27	3,26	3,25	0,010	0,002	0,945	0,328
Lactose	4,93	4,90	4,90	4,86	0,015	<0,001	0,722	0,353
NUL <sup>5</sup> , mg/dL	14,1	13,9	14,8	14,8	0,243	0,136	0,759	0,795
Eficiência leiteira								
Leite : CMS <sup>6</sup>	1,41	1,37	1,36	1,39	0,017	0,160	0,102	0,960
LCE : CMS <sup>7</sup>	1,42	1,37	1,37	1,37	0,020	0,073	0,153	0,563
SPM <sup>8</sup> (kg/dia)	2,80	2,73	2,74	2,44	0,051	0,007	0,174	0,295

<sup>1</sup>Dieta controle (0) com silagem de milho na proporção de 480 g/kg da MS da dieta e silagem de planta inteira de soja substituindo a silagem de milho na ordem de 167, 333 e 500 g/kg da MS do volumoso (16, 33 e 50, respectivamente); <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Probabilidade para efeito linear (L), quadrático (Q) e cúbico (C); <sup>4</sup>Leite corrigido para energia; <sup>5</sup>Nitrogênio ureico no leite; <sup>6</sup>Relação produção de leite e consumo de matéria seca; <sup>7</sup>Relação produção corrigida para energia e consumo de matéria seca; <sup>8</sup>Síntese de proteína microbiana.

Em geral a inclusão de SS diminuiu linearmente ( $P < 0,001$ ) a concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média ( $< C16$ ) e ácidos graxos saturados (AGS) na gordura do leite, bem como aumentou linearmente ( $P < 0,001$ ) aqueles de cadeia longa ( $> C16$ ) e AGI aumentando assim ( $P < 0,001$ ) a relação AGS:AGI (Tabela 4.5). Ainda, SS reduziu linearmente ( $P \leq 0,004$ ) as concentrações de C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0 e C16:1. Por outro lado, SS aumentou linearmente ( $P \leq 0,026$ ) as concentrações de C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-11, C18:1 *cis*-9 e C18:2 *cis*-9, *trans*-12, sem afetar ( $P \geq 0,119$ ) as concentrações de C18:2 *cis*-9,11 e C18:3 *cis*-9,12,15.

Tabela 4.5 - Perfil de ácidos graxos da gordura do leite de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.

Ácidos graxos, g/100g	Tratamentos <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P-valor <sup>3</sup>		
	0	16	33	50		L	Q	C
C6:0	1,77	1,74	1,71	1,67	0,022	0,004	0,969	0,95
C8:0	1,21	1,15	1,10	1,03	0,017	<0,001	0,941	0,78
C10:0	3,06	2,79	2,60	2,36	0,047	<0,001	0,809	0,62
C11:0	0,080	0,072	0,058	0,049	0,0024	<0,001	0,972	0,57
C12:0	3,67	3,30	3,04	2,76	0,052	<0,001	0,560	0,71
C13:0	0,160	0,102	0,045	0,031	0,0076	<0,001	0,087	0,45
C14:0	12,1	11,4	11,0	10,4	0,088	<0,001	0,885	0,31
C14:1	0,987	0,943	0,832	0,827	0,0266	<0,001	0,335	0,023
C15:0	1,00	0,942	0,857	0,821	0,0131	<0,001	0,501	0,39
C16:0	33,6	31,5	31,6	30,1	0,178	<0,001	0,354	0,004
C16:1	1,41	1,34	1,24	1,24	0,024	<0,001	0,255	0,27
C17:0	0,543	0,500	0,466	0,455	0,0035	<0,001	0,002	0,50
C18:0	10,3	11,7	12,8	13,3	0,183	<0,001	0,008	0,58
C18:1 <i>trans</i> -9	0,166	0,205	0,205	0,232	0,0035	<0,001	0,213	0,003
C18:1 <i>trans</i> -11	0,898	0,988	1,02	1,08	0,0143	<0,001	0,468	0,36
C18:1 <i>cis</i> -9	22,5	24,4	24,9	26,2	0,279	<0,001	0,405	0,19
C18:2 <i>cis</i> -9,12	2,44	2,55	2,52	2,60	0,035	0,026	0,669	0,19
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,195	0,223	0,171	0,260	0,0155	0,123	0,146	0,017
C18:3 <i>cis</i> -9,12,15	0,007	0,027	0,011	0,045	0,0062	0,077	0,542	0,12
Outros	2,05	2,28	2,09	2,36	0,050	0,027	0,804	0,013
<C16	60,6	57,2	55,7	52,9	0,320	<0,001	0,626	0,16
>C16	36,9	40,6	42,4	44,2	0,353	<0,001	0,053	0,29
AGI <sup>4</sup>	28,6	30,7	31,0	32,5	0,336	<0,001	0,490	0,095
AGS <sup>5</sup>	69,3	67,0	66,9	65,1	0,355	<0,001	0,544	0,046
AGI : AGS	0,417	0,462	0,467	0,505	0,0076	<0,001	0,672	0,085

<sup>1</sup>Dieta controle (0) com silagem de milho na proporção de 480 g/kg da MS da dieta e silagem de planta inteira de soja substituindo a silagem de milho na ordem de 167, 333 e 500 g/kg da MS do volumoso (16, 33 e 50, respectivamente); <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Probabilidade para efeito linear (L), quadrático (Q) e cúbico (C); <sup>4</sup>Ácidos graxos insaturados; <sup>5</sup>Ácidos graxos saturados.

A substituição de SM por SS linearmente aumentou ( $P \leq 0,021$ ) as concentrações de NUS e AST ao passo que afetou de maneira quadrática ( $P = 0,002$ ) a glicemia com o menor valor observado para o tratamento 33, sem afetar ( $P \geq 0,308$ ) a concentração de GGT (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Metabólitos séricos de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P-valor <sup>3</sup>		
	0	16	33	50		L	Q	C
Glicose, mg/dL	68,4	64,3	64,0	69,0	0,776	0,815	0,002	0,81
NUS <sup>4</sup> , mg/dL	36,3	41,4	44,2	44,8	0,745	<0,001	0,093	0,88
AST <sup>5</sup> , U/L	63,2	64,2	64,8	68,9	1,30	0,021	0,359	0,62
GGT <sup>6</sup> , U/L	25,6	24,6	24,8	25,8	0,594	0,817	0,308	0,92

<sup>1</sup>Dieta controle (0) com silagem de milho na proporção de 480 g/kg da MS da dieta e silagem de planta inteira de soja substituindo a silagem de milho na ordem de 167, 333 e 500 g/kg da MS do volumoso (16, 33 e 50, respectivamente); <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Probabilidade para efeito linear (L), quadrático (Q) e cúbico (C); <sup>4</sup>Nitrogênio ureico sérico; <sup>5</sup>Aspartato aminotransferase; <sup>6</sup>Gama glutamil transferase.

A inclusão de SS aumentou linearmente ( $P = 0,005$ ) a atividade de ruminação (min/kg FDN) e afetou de forma quadrática ( $P \leq 0,049$ ) as atividades de ruminação e mastigação (min/dia) com o maior valor observado para o tratamento 16 e ruminação (min/kg MS) com o maior valor observado para o tratamento 33 (Tabela 4.7). Não houve efeito ( $P \geq 0,059$ ) dos tratamentos sobre os tempos de ingestão de água, comendo, deitada, em pé e ócio (min/d), bem como para tempo de mastigação e consumo em min/kg FDN e MS.

Tabela 4.7 - Comportamento ingestivo de vacas alimentadas com diferentes níveis de substituição da silagem de milho por silagem de planta inteira de soja.

Item	Tratamento <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P-valor <sup>3</sup>		
	0	16	33	50		L	Q	C
Atividades, min/dia								
Bebendo água	33,3	33,5	29,6	32,5	1,50	0,622	0,642	0,40
Comendo	306	317	301	304	3,94	0,535	0,471	0,18
Deitada	732	717	750	771	11,4	0,111	0,391	0,52
Em pé	708	723	690	669	11,4	0,111	0,391	0,52
Ruminando	489	520	519	511	7,16	0,024	0,004	0,38
Ócio	606	569	588	592	8,51	0,651	0,088	0,17
Mastigando	801	837	822	816	8,61	0,532	0,049	0,21
Atividade, min/kg de FDN consumido								
Mastigando	103	106	107	107	1,71	0,129	0,460	0,66
Comendo	40,2	40,9	39,7	40,0	0,76	0,682	0,853	0,52
Ruminando	63,2	67,1	68,3	67,3	1,20	0,005	0,090	0,66
Atividade, min/kg de MS consumido								
Mastigando	34,4	36,0	35,8	36,0	0,59	0,059	0,219	0,41
Comendo	13,2	13,9	13,3	13,4	0,26	0,849	0,351	0,18
Ruminando	21,0	22,3	22,9	22,6	0,41	0,001	0,026	0,95

<sup>1</sup>Dieta controle (0) com silagem de milho na proporção de 480 g/kg da MS da dieta e silagem de planta inteira de soja substituindo a silagem de milho na ordem de 167, 333 e 500 g/kg da MS do volumoso (16, 33 e 50, respectivamente); <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Probabilidade para efeito linear (L), quadrático (Q) e cúbico (C).

#### 4.6 DISCUSSÃO

A inclusão de SS em substituição a SM aumentou o consumo de partículas longas, e reduziu a digestibilidade da FDN. Tais resultados são conhecidamente potenciais limitadores de consumo e consequentemente da produção de leite em ruminantes independente da origem (OBA; ALLEN, 1999; NASROLLAHI et al., 2015). Além disso, embora bem estabelecido na literatura que o teor de AG dietético pode deprimir a digestibilidade aparente no trato total da FDN (HARVATINE; ALLEN, 2006), o nível de EE utilizado no presente estudo foi menor do que os praticados nos estudos que apresentaram efeito deletério da gordura na digestibilidade da MS e FDN (WELD; ARMENTANO, 2017). A redução do consumo de nutrientes quando substituída SM por SS, com exceção ao FDN (em função do maior consumo de partículas

longas) e do EE (em função da compensação do maior teor de EE nas dietas com SS) está intimamente correlacionado a queda no CMS. De forma similar, Vargas-Bello-Pérez et al. (2008) reportaram uma redução no CMS e digestibilidade da FDN em vacas alimentadas com SS. Uma vez que não houve efeito sobre o ECC (dados não apresentados) a relação entre CMS e PV diminuiu e entre FDN e PV não foi alterada com a inclusão de SS na dieta.

Efeitos sobre a digestibilidade aparente no trato total da MS e MO foram capitaniados pela redução generalizada da digestibilidade dos nutrientes, particularmente do FDN e PB em vacas alimentadas com SS em comparação com controle. De maneira geral a ensilagem de leguminosas está associada com extensiva proteólise, alterando a proporção entre proteína verdadeira e compostos nitrogenados não proteicos de menor valor biológico (BRODERICK, 1995) e potencialmente maior teor de proteína indigestível associada a fração fibrosa quando comparado com SM, diminuindo a disponibilidade de nitrogênio para SPM ruminal. Além disso, a inclusão de farelo de soja tratado termicamente (Soypass<sup>®</sup>) para balancear os níveis de PDR e PNDR entre os tratamentos pode ter contribuído em menor grau com a redução da digestibilidade da PB em função do maior teor de PIDN em sua composição (NASRI et al., 2008). Essa menor digestibilidade da PB na SS, pode também estar associada a maior presença da enzima polifenol oxidase (tipicamente encontrada em leguminosas; LEE, 2014) responsável pela formação de complexos proteico-fenólicos aumentando assim a proteção da proteína contra ação microbiana ruminal.

Por outro lado, a inclusão de SS aumentou de forma linear a concentração ruminal de  $\text{NH}_3\text{-N}$ . De acordo com Kung Jr et al. (2018), leguminosas ensiladas com baixo teor de MS como observado no presente estudo, são suscetíveis a proteólise e formação de  $\text{NH}_3\text{-N}$  na massa ensilada.

A inclusão de SS não afetou a concentração total de AG no líquido ruminal, semelhante ao encontrado por Vargas-Bello-Perez et al. (2008), entretanto, observou-se no presente estudo, redução linear na concentração de ácido propiônico e aumento de ácido butírico e AGCR. O aumento da concentração ruminal de AGCR pode estar relacionado a baixa taxa de atividade de bactérias ruminais celulolíticas, uma vez que AGCR são substratos para o crescimento de bactérias como *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, e *Eurobacterium ruminantium* (ANDRIES et al., 1987).

O aumento linear do pH observado em animais alimentados com SS reflete o comportamento da concentração ruminal de  $\text{NH}_3\text{-N}$  (uma base fraca; WANG; FUNG 1996) e ingestão de partículas longas que estimula a ruminação e salivação (ZEBELI et al., 2006). A saliva é uma importante fonte de compostos com poder tampão e bases, como fosfatos e

bicarbonatos (MAEKAWA et al., 2002). Ainda, o aumento da relação ácido acético:ácido propiônico no rúmen pode contribuir para o aumento do pH em função da diferença de pKa específico de cada ácido (CISTOLA et al., 1982; WANG; FUNG, 1996). Resultado similar foi encontrado por Shanshan et al. (2016) ao utilizarem o consórcio de silagens de leguminosas e gramíneas na dieta de vacas leiteiras.

De acordo com Zhu et al. (2013), MO é substrato fundamental responsável pela magnitude da SPM. Embora o efeito do tipo de forragem na SPM seja inconsistente na literatura (KHORASANI et al., 2001), os autores reportam menor degradação de PB e fluxo de proteína microbiana para o duodeno quando incluído silagem de trevo vermelho na dieta de vacas leiteiras (SCHULZ et al., 2018). Apesar de limitadas as informações sobre a degradação ruminal da proteína oriunda da SS, considerando a redução da SPM observada no presente estudo, SS potencialmente supre menor relação entre PDR:PNDR do que estimado pelo NRC (2001), entretanto, com a menor degradabilidade intestinal da PNDR em função da maior PB associada a parede celular (ERASMUS et al., 1994).

A quantidade de proteína metabolizável e o perfil de aminoácidos desta podem ser fatores limitantes para produção de leite e teor de proteína. Baseado no perfil aminoacídico dos ingredientes (NRC, 2001), sugere-se que a substituição de SM por SS, mesmo com ajustes no teor dietético de PB, pode ter causado um desbalanceamento no atendimento de aminoácidos essenciais como a metionina e lisina.

A produção de LCE, gordura, proteína e lactose foram reduzidas linearmente com a inclusão de SS na dieta das vacas. Esses resultados são reflexo tanto da redução de produção quanto dos teores de sólidos no leite. A queda marginal na concentração de gordura pode estar relacionado a concentração de ácido acético ruminal que contribui com a redução da produção de LCE uma vez que este é o principal substrato para síntese *de novo* the ácidos graxos do leite em vacas de meio de lactação (URRUTIA; HARVATINE, 2017).

Apesar do efeito quadrático da SS sobre a concentração de glicose sérica, acredita-se que a redução linear no teor de ácido propiônico pode ter contribuído com a redução de substrato para a gliconeogênese hepática o qual por sua vez reduz a síntese de lactose no tecido epitelial do alvéolo mamário (WANG et al., 2016). Embora, o teor de ácido propiônico não tenha efeito direto sobre a síntese de lactose, a redução na síntese deste carboidrato no alvéolo mamário está diretamente relacionada com a produção de leite (LIN et al., 2016).

Dewhurst et al. (2003) demonstraram maiores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados na gordura do leite de vacas alimentadas com silagens de leguminosas. Além disso, vários estudos tem demonstrado aumento na concentração de AGI no leite após a inclusão de



grãos de soja integral da dieta de vacas leiteiras (CHILLIARD et al., 2009; VENTURELLI et al., 2015; BARLETTA et al., 2016). Grãos de soja são ricos em AGI principalmente C18:2 *cis*-9, *cis*-12 (VENTURELLI et al., 2015). No presente estudo, ácidos graxos de cadeia longa (> C16) e insaturados foram linearmente aumentados na gordura do leite. Esses resultados estão correlacionados com aumento do consumo de EE a partir da inclusão de SS na dieta. A maior ingestão de SS implica diretamente na incorporação de AGI e de cadeia longa bem como daqueles saturados a partir da biohidrogenação ruminal (C18:1 *cis* 9 em C18:0; BARLETTA et al., 2016).

A biohidrogenação parcial de ácidos graxos pode potencialmente reduzir a síntese de *de novo* na glândula mamária (CHILLIARD et al., 2009). Embora a proporção dos AG C18:1 *trans* 9 e C18:1 *trans* 11 tenha aumentado, aparentemente a síntese de gordura do leite não foi prejudicada pela presença de AG *trans* até o nível de inclusão da SS utilizada nesse estudo. O substancial aumento de AGI na gordura do leite em vacas alimentadas com SS, reflete uma redução da biohidrogenação ruminal (DEWHURST et al., 2003). A proteção natural do grão contra liberação de lipídeos livres no rúmen diminui a biohidrogenação ruminal de C18:2 *cis*-9, *cis* 12 e reduz o efeito de depressão da gordura do leite pela formação de isômeros (BARLETTA et al., 2016).

Quando a taxa de produção de NH<sub>3</sub>-N ruminal excede a taxa de fermentação de carboidratos, a eficiência de conversão da amônia em proteína microbiana reduz (RUSSEL et al., 1992) e nesse cenário o excedente de N amoniacal pode ser perdido por meio do fluxo intestinal e excretado nas fezes (Aschenbach et al., 2010) ou absorvida através da parede do rúmen, metabolizada pelos hepatócitos transformando-a em ureia (LAPIERRE; LOBLEY 2001), sendo então excretada via urina e/ou leite. Por ser um sensível marcador de atividade celular hepática (STOJEVIC et al., 2005), o aumento da concentração sérica da enzima AST em vacas alimentadas com SS revela o aumento do metabolismo hepático causado ao menos em parte pelo aporte de N.

Vacas alimentadas com maiores níveis de SS na dieta demandaram mais tempo ruminando por unidade de FDN consumido em função do maior tamanho médio de partículas e menor digestibilidade aparente no trato total da FDN (OBA; ALLEN, 1999).

#### 4.7 CONCLUSÕES

A inclusão de silagem de planta inteira de soja ensilada no estágio fenológico R5,5 substituindo a silagem de milho em até 500 g/kg reduz o consumo alimentar e desempenho das

vacas sem afetar o teor de gordura do leite. Entretanto, essa substituição é capaz de modular a fermentação ruminal e o perfil da gordura do leite aumentando o pH e a concentração de ácidos graxos de cadeia longa e insaturados respectivamente.

#### 4.8 REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA, EUA, 2000.

ANDRIES, J. I.; BUYASSE, F. X.; DE BRABANDER, D. L.; COTTYN, B. G. Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances - A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 18, p. 169-180, 1987.

BAGHDADI, A.; HALIM, R. A.; RADZIAH, O.; MARTINITHÉ, M. Y.; EBRAHIMI, M. Fermentative characteristics and nutritive value of corn silage intercropped with soybean under different crop combination ratios. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1710-1717, 2016.

BARLETTA, R. V.; GANDRA, J. R.; FREITAS JUNIOR, J. E.; VERDURICO, L. C.; MINGOTI, R. D.; BETTERO, V. P.; BENEVENTO, B. C.; VILELA, F. G.; RENNO, F. P. High levels of whole raw soya beans in dairy cow diets: digestibility and animal performance. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, n. 6, p. 1179-1190, 2016.

BRODERICK, G. A.; KANG, J. H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid in vitro media. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 64-75, 1980.

BRODERICK, G. A. Desirable characteristics of forage legumes for improving protein utilization in ruminants. **Journal Animal Science**, v. 73, p. 2760-2773, 1995.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 11, p. 2964-2971, 1997.

BRODERICK, G. A.; KOEGEL, R. G.; WALGENBACH, R. P.; KRAUS, T. J. Ryegrass or Alfalfa Silage as the Dietary Forage for Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1894-1901, 2002.

CASALI, A. O.; DETTMANN, E.; VALADARES, F. S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUE, L. T.; FREITAS, S. C.; PAULINO, M. F. Influence of incubation time and particles size on indigestible compounds contents in cattle feeds and feces obtained by in situ procedures. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 335-342, 2008.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details**. Bucksburnd, Aberdeen, Rowett Research Instatute, 1992, p. 21.

CHILLIARD, Y.; MARTIN, C.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 5199-5211, 2009.

CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; TEDESCHI, L. O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v.113, n. 2, p.218-225, 2008.

CISTOLA, D. P.; SMALL, D. M.; HAMILTON, J. A. Ionização behavior of aqueous short-chain carboxylic acids: a carbon-13 NMR study. **Journal of Lipid Research**, v. 23, p. 795-799, 1982.

DEWHURST, R. J.; FISHER, W. J.; TWEED, J. K. S.; WILKINS, R. J. Comparison of grass and legume silages for milk production. Production responses with different level of concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 8, p. 2598-2611, 2003.

ERASMUS, L. J.; BOTHA, P. M.; CRUYWAGEN, C. W.; MEISSNER, H. H. Amino acid profile and intestinal digestibility in dairy cows of rumen-undegradable protein from various feedstuffs. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 541-551, 1994.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; **Stage of soybean development**. Special report 80. Co-operative Extension Service, Iowa State University, Ames, Iowa, EUA, 1977.

FENG, S.; LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. A rapid method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3785-3788, 2004.

GANDRA, J. R.; TAKIYA, C. S.; DEL VALLE, T. A.; OLIVEIRA, E. R.; DE GOES, R. H. T. B.; GANDRA, E. R. S.; BATISTA, J. D. O.; ARAKI, H. M. C. Soybean whole-plant ensiled with chitosan and lactic acid bacteria: Microorganism counts, fermentative profile, and total losses. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 1-10, 2018.

GOBETTI, S. T. C.; NEUMANN, M.; OLIVEIRA, M. R.; OLIBONI, R. Produção e Utilização da silagem de planta inteira de soja (*Glicine max*) para ruminantes. **Ambiência**, v.7, n. 3, p. 603-616, 2011.

HALL, M. B. **Calculation of Non-structural Carbohydrate Content of Feeds That Contain Non-Protein Nitrogen**, University of Florida, Gainesville p. A-25, Bulletin 339, 2000.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 1092-1103, 2006.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1306-1311, 1993.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3, p. 211-227, 1994.

JOHANSEN, M.; LUND, P.; WEISBJERG, M. R. Feed intake and milk production in dairy cows fed different grass and legume species: A meta-analysis. **Animal**, v. 12, n. 1, p. 66–75, 2018.

KENWARD, M. G.; ROGER, J. H. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, v. 53, n. 3, p. 983-997, 1997.

KHORASANI, G. R.; OKINE, E. K.; KENNELLY, J. J. Effects of forage source and amount of concentrate on rumen and intestinal digestion of nutrients in late-lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 5, p. 1156-1165, 2001.

KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J.; BUCKMASTER, D. R. Modification of the Penn State Particle Separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1858– 1863, 2003.

KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R.; SAUER, F. D.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids** v. 32, n. 11, p. 1219-1228, 1997.

KUNG JR, L.; SHAVER, R.; GRANT, R. J.; SCHMIDT, R. J. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4020-4033, 2018.

LAPIERRE, H.; LOBLEY, G. E. Nitrogen Recycling in the Ruminant: A Review. **Journal of Dairy Science**, v. 84, 2001. Suplemento E223-E236.

LEE, M. R. F. Forage polyphenol oxidase and ruminant livestock nutrition. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, n. 1, p. 71-79, 2014.

LIN, Y.; SUN, X.; HOU, X.; QU, B.; GAO, X.; LI, Q. Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n.81, p. 1-11, 2016.

MAEKAWA, M, BEAUCHEMIN, K. A.; CHRISTENSEN, D. A. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1165-1175, 2002.

NASRI, M. H. F.; FRANCE, J.; DANESH MESGARAN, M.; KEBREAB, E. Effect of heat processing on ruminal degradability and intestinal disappearance of nitrogen and amino acids in Iranian whole soybean. **Livestock Science**, v. 113, n. 1, p. 43-51, 2008.

NASROLLAHI, S. M.; IMANI, M.; ZEBELI, Q. A meta-analysis and meta-regression of the effect of forage particle size, level, source, and preservation method on feed intake, nutrient digestibility, and performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8926-8939, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7 ed. Washington, DC, 2001. p. 381.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 589–96, 1999.

ROSA, L. O.; PEREIRA, O. G.; RIBEIRO, K. G.; VALADARES, F. S. C.; CECON, P. R. Fermentation profile and microbial population in soybean silage with inoculant and powdered molasses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1586-1594, 2018.

RUSSEL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. G.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. Anet carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SCHULZ, F.; WESTREICHER-KRISTEN, E.; KNAPPSTEIN, K.; MOLKENTIN, J.; SUSENBETH, A. Replacing maize silage plus soybean meal with red clover silage plus wheat in diets for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 2, p. 1216-1226, 2018.

SHAN-SHAN, S.; ZHANG, N.; LI, Q. Effect of different roughages on milk protein and milk fat synthesis in dairy cows. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 23, n. 4, p. 40-46, 2016.

SILVEIRA, C.; OBA, M.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Selection of barley grain affects ruminal fermentation, starch digestibility, and productivity of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2860-2869, 2007.

STAGNARI, F.; MAGGIO, A.; GALIENI, A.; PISANTE, M. Multiple benefits of legumes for agriculture sustainability: an overview. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 2, p. 2-13, 2017.

STOJEVIĆ, Z.; PIRŠLJIN, J.; MILINKOVIĆ-TUR, S.; ZDELAR-TUK, M.; LJUBIĆ, B. B. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. **Veterinarski. Arhiv**, v. 75, n. 1, p. 67-73, 2005.

TYRRELL, H. F.; REID, J. T. Prediction of the energy value of cow's milk. **Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 9, p. 1215-1223, 1965.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THIEX, N. **Forage analyses procedures**. Omaha, USA, 1993, p. 154.

URRUTIA, N. L.; HARVATINE, K. J. Acetate Dose-Dependently Stimulates Milk Fat Synthesis in Lactating Dairy Cows. **Journal of Nutrition**, v. 147, n. 5, p. 763-769, 2017.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A.; Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VARGAS-BELLO-PEREZ, E.; MUSTAFA, A. F.; SEGUIN, P. Effects of feeding forage soybean silage on milk production, nutrient digestion, and ruminal fermentation of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 1, p. 229-235, 2008.

VENTURELLI, B. C.; DE FREITAS JÚNIOR, J. E.; TAKIYA, C. S.; DE ARAÚJO, A. P. C.; SANTOS, M. C. B.; CALOMENI, G. D.; GARDINAL, R.; VENDRAMINI, T. H. A.; RENNÓ, F. P. Total tract nutrient digestion and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets containing different levels of whole raw soy beans. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 6, p. 1149- 1160, 2015.

VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 243-248, 1990.

WANG, B.; ZHAO, F. Q.; ZHANG, B. X.; LIU, J. X. An insufficient glucose supply causes reduced lactose synthesis in lactating dairy cows fed rice straw instead of alfalfa hay. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 11, p. 4771-4780, 2016.

WANG, J.; FUNG, D. Y. Alkaline-fermented foods: A review with emphasis on pidan fermentation. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 101-138. 1996.

WELD, K. A.; ARMENTANO, L. E. The effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1766-1779, 2017.

ZEBELI, Q.; TAJAJ, M.; STEINGASS, H.; METZLER, B.; DROCHNER, W. Effects of physically effective fiber on digestive processes and milk fat content in early lactating dairy cows fed total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 651-668, 2006.

ZHU, W.; FU, Y.; WANG, B.; WANG, C.; YE, J.A.; WU, Y. M.; LIU, J. X. Effects of dietary forage sources on rumen microbial protein synthesis and milk performance in early lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 3, p. 1727-1734. 2013.

## 5 IMPLICAÇÕES

Com objetivo de contribuir com futuras pesquisas, gostaríamos de compartilhar algumas observações pessoais obtidas durante a realização desse estudo.

Embora agronomicamente seja possível classificar o ponto de colheita de acordo com o estágio fenológico de desenvolvimento da cultura da soja, é fundamental realizar o acompanhamento do teor de matéria seca da planta para tomada de decisão, pois ainda não se sabe se o padrão de comportamento bromatológico encontrado neste estudo é consistente independentemente de fatores agronômicos como, taxa de semeadura, híbrido, adubação, ataque de doenças e pragas por exemplo.

A elevada estabilidade aeróbica apresentada pela silagem de planta inteira de soja não reflete a melhor conservação do material e por isso, aparentemente a estabilidade aeróbica não é uma variável a ser considerada na avaliação qualitativa de silagens de planta inteira de soja, diferentemente do comumente utilizado para silagens como a de milho e grãos de cereais por exemplo. Durante o período de avaliação da estabilidade aeróbica, observamos que o material exposto ao ar já apresentava sinais visuais de deterioração por volta de 3-4 dias de exposição o que nos levou a encerrar o processo de avaliação com 138 horas.

É notório o efeito positivo do teor de matéria seca no momento da ensilagem sobre a qualidade da silagem produzida. Esse aumento pode ser feito tanto pelo avanço no ponto de colheita no experimento 1, quanto pela adição de aditivos com teor de matéria seca mais elevado e com capacidade de absorção e diluição da umidade da planta, efeito esse que pôde ser observado quando da utilização do melaço no experimento 2.

Visualmente, a silagem de planta inteira de soja tem uma coloração verde escuro e cheiro peculiar moderado, que diminuem a intensidade a medida que avançamos no ponto de colheita e também com o passar dos dias trabalhando com o material. Além da composição bromatológica, acreditamos que essas características organolépticas da silagem de planta inteira de soja podem ter contribuído para redução linear no desempenho dos animais. Porém, curiosamente não foi observado alteração comportamentais visíveis dos animais (aversão, intensidade de bocado por exemplo) quando fornecida dieta contendo silagem de planta inteira de soja independente do nível de inclusão. Embora significativa, a diferença de consumo observada neste experimento entre o grupo controle e o maior nível de inclusão da silagem de planta inteira de soja foi de “apenas” 0,6 kg, sugerindo que a intensidade com que fatores organolépticos afetam no consumo e desempenho é baixa e pode ser minimizada dependendo

da qualidade da silagem produzida. Ainda, em função do arranjo de tratamentos utilizado no experimento 3, não foi apresentado resultados de teste de médias, contudo não foi observado diferença entre as médias do grupo controle e 16 % de inclusão da silagem de planta inteira de soja para as variáveis de consumo e produção de leite.

Assim, a decisão do uso da silagem da planta inteira de soja na alimentação de vacas leiteiras varia desde a qualidade do material produzido (que por sua vez deriva de fatores muitas vezes ainda não concretamente estudados), até o custo de sua produção bem como dos ingredientes utilizados nas dietas desses animais. Por isso, é preciso uma avaliação mais detalhada a respeito do custo envolvendo a produção da silagem de planta inteira de soja. Baseado nos dados de produção estimados e a taxa de recuperação da matéria seca em cada estágio fenológico, a utilização do melaço na dose proposta no trabalho dobra o custo por kg de matéria seca de silagem produzida entre R3 a R7. Contudo, ao considerarmos o custo de produção da proteína bruta oriunda da silagem de planta inteira de soja, esse valor ainda é menor do que aquele tipicamente praticado pelo produtor para aquisição do mesmo kg de proteína via farelo de soja em épocas como a que estamos passando atualmente (setembro 2020) por exemplo (Tabela 4.1). Vale ressaltar que quando colhida nos estádios fenológicos R6 e R7 essa vantagem econômica do ponto de vista da proteína aconteceria mesmo com o uso do melaço.

Tabela 5.1 – Estimativa de custo de produção da silagem de planta inteira de soja.

Item	Estádio fenológico				
	R3	R4	R5	R6	R7
Produção de MS <sup>1</sup> , T/ha	8,10	8,69	10,7	11,3	12,0
Produção de PB <sup>2</sup> , T/ha	0,963	0,983	1,16	1,83	2,19
Custo de produção <sup>3</sup> R\$ 2.500,00/ha					
Custo R\$/kg da MS	0,31	0,29	0,23	0,22	0,21
Custo R\$/kg da PB	2,60	2,54	2,16	1,36	1,14
Diferença para o farelo de soja 46% <sup>4</sup>					
Diferença R\$/kg da PB	-1,60	-1,66	-2,04	-2,84	-3,06

<sup>1</sup>Produção estimada a partir da população de plantas de 277.200/ha

<sup>2</sup>Produção estimada considerando a taxa de recuperação de MS encontrada no estudo em cada estágio fenológico;

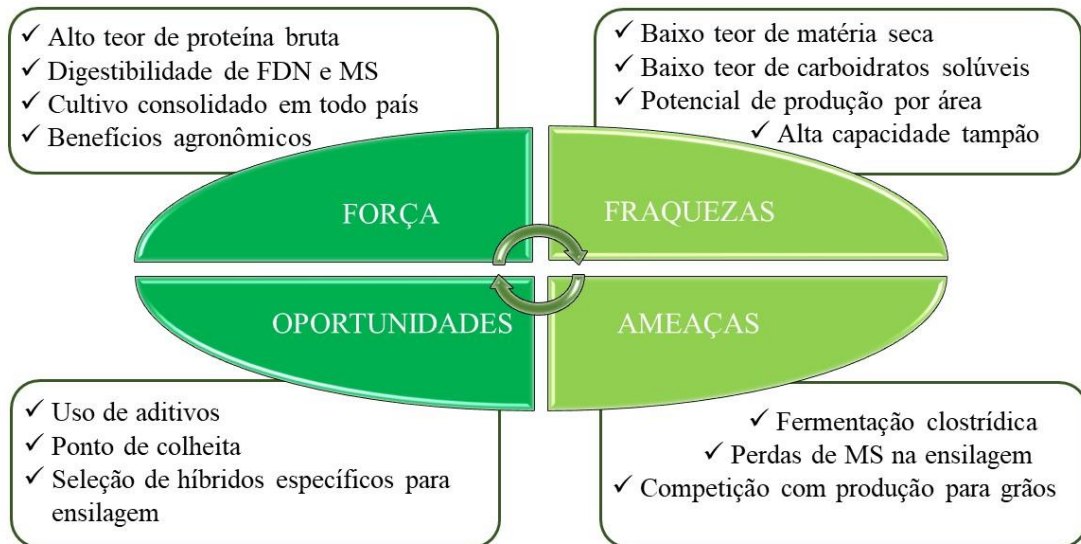
<sup>3</sup>Custo operacional efetivo sem considerar uso de aditivos.

<sup>4</sup>Custo de R\$ 1.700,00/tonelada de matéria natural para aquisição do farelo de soja 46% de PB na matéria seca com 12% de umidade.

Baseado no exposto, elaborou-se um plano de análise dos pontos fortes, fracos, ameaças e oportunidades da utilização da cultura da soja na nutrição animal como fonte de proteína oriunda de forragem na forma de silagem (Figura 5.1).



Figura 5.1 - Análise da adoção de silagem de planta inteira de soja no sistema de produção animal



Fonte: Ghizzi (2020)

Acreditamos que a silagem de planta inteira de soja tem espaço na nutrição de ruminantes, especialmente em épocas de custo alimentar alto. Contudo é preciso saber posicionar esse material na dieta de ruminantes, uma vez que ela não é um “concorrente” da silagem de milho, mas sim um ingrediente complementar no balanceamento de dietas com potencial de suprir exigência proteica, energética e de fibra fisicamente efetiva.

Fica evidente a necessidade da continuidade das pesquisas com foco na viabilização dessa tecnologia no campo, principalmente no que diz respeito a conservação do material. Também o início de pesquisas com foco na seleção de híbridos com maior fração de fibra digestível visto que este tem sido o maior entrave no desempenho animal quando utilizado silagem de planta inteira de soja na dieta.